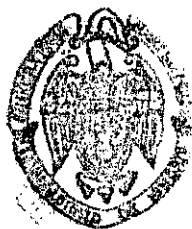




\* 5 3 0 9 8 4 2 7 0 2 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTUDIO**  
**INMUNOHISTOQUÍMICO**  
**DE LA EXPRESIÓN DE LOS**  
**ISOANTÍGENOS SANGUÍNEOS**  
**EN EL CARCINOMA DUCTAL**  
**NO ESPECÍFICO**  
**DE MAMA**



ARCHIVO

---

**M<sup>o</sup>. LUISA HERRANZ ALADRO**

---

***ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN  
DE LOS ISOANTÍGENOS SANGUÍNEOS EN EL  
CARCINOMA DUCTAL NO ESPECÍFICO  
DE MAMA***

---

Tesis presentada para optar al grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

por

**M<sup>a</sup>. Luisa Herranz Aladro**

---

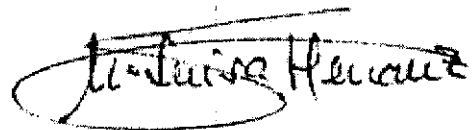
Realizada en el Departamento de Anatomía Patológica  
Hospital "General Universitario Gregorio Marañón" de Madrid  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, FACULTAD DE MEDICINA

Dirigida por el Profesor Dr. Emilio Alvarez Fernández

Vº.Bº.



Dr. D. Emilio Alvarez Fernández  
Prof. Titular de Anatomía Patológica



D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. Luisa Herranz Aladro  
El interesado

El Dr. D. Emilio ALVAREZ FERNÁNDEZ, Profesor Titular de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

### CERTIFICA

Que ha leído en su redacción final el trabajo de investigación "*Estudio inmunohistoquímico de la expresión de los isoantígenos sanguíneos en el carcinoma ductal no específico de mama*" realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. Luisa HERRANZ ALADRO como base de su memoria de Tesis Doctoral y considera que reúne los requisitos necesarios para ser defendida en pública lectura según la normativa vigente.

Madrid, 17 de Marzo de 1998.



Fdo.: Emilio Alvarez Fernández  
Prof. Titular de Anatomía Patológica

---

**Agradecimientos:**

Al **Dr. D. Emilio Alvarez** que me ha dirigido esta Tesis, me ha facilitado los medios para poder realizarla y me ha dado en todo momento apoyo, estímulo y confianza.

Al **Dr. D. Agustín Zapata** por iniciarme en el fascinante mundo de la Inmunología.

Al **Dr. D. Luis Carretero** por su desinteresada colaboración en la selección y diagnóstico del material utilizado en este estudio.

A **D<sup>a</sup>. Pilar Aparicio** por su infinita paciencia e inestimable ayuda en la realización de este trabajo.

A **D<sup>a</sup>. Soledad Aladro y D. José Luis Ariza** por facilitarme los programas informáticos.

A **D. Ángel Serrano** por su asesoramiento en el campo estadístico.

A **D. Luis López** por su eficaz colaboración en la realización del material gráfico.

---

Al **Dr. D. Francisco Martínez** por haber contrastado serológicamente nuestros resultados.

A **D<sup>a</sup>. Carmen Blas** por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A **todo el personal, amigos y compañeros** del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por su amable colaboración y consejos.

Y **a mi madre, mi hermano, familiares y amigos** por su comprensión y palabras de aliento en los períodos de desanimo.

Gracias M.L.H.

---

# Índice

## **I. Introducción**

1.1. Etiología del carcinoma de mama	1
1.2. Terapéutica	14
1.3. Factores pronósticos	16
1.4. Perspectivas	18
1.5. Hipótesis de trabajo	24
1.6. Objetivos	26

## **II. Material y Métodos**

2.1. Obtención del material, fijación y procesamiento básico	28
2.2. Demostración de antígenos tumorales	29
2.3. Demostración de isoantígenos de grupos sanguíneos	30
2.4. Características de los anticuerpos utilizados	33
2.4.1. Anticuerpos para la demostración de hormonas esteroides	33
2.4.2. Anticuerpos para la demostración de proliferación celular	35
2.4.2.1. Anti Ki67 (Mib-1)	35
2.4.2.2. Anti PCNA (PC10)	40
2.4.3. Anticuerpos para la demostración de isoantígenos sanguíneos	43
2.4.4. Características de los indicadores pronósticos histopatológicos	50

2.5. Valoración de los resultados	54
2.5.1. Expresión de los receptores hormonales	55
2.5.2. Expresión de los marcadores de proliferación	55
2.5.3. Expresión de los grupos sanguíneos (A,B,O)	56
2.5.4. Expresión de isoantígenos sanguíneos Lewis	56
2.6. Análisis estadístico	57

### **III. Resultados**

3.1. Marcadores histopatológicos	59
3.1.1. Tamaño del tumor	60
3.1.2. Afectación de ganglios linfáticos regionales	60
3.1.3. Grado histológico	60
3.1.4. Grado nuclear	61
3.2. Expresión de receptores hormonales	61
3.2.1. Receptor de estrógenos	61
3.2.2. Receptor de progesterona	61
3.3. Expresión de los marcadores de proliferación	63
3.3.1. Marcador de proliferación Ki67 (Mib-1)	63
3.3.2. Marcador de proliferación PCNA (PC10)	64

---

3.4. Expresión de grupos sanguíneos (A,B,O)	64
3.4.1. Grupo A	66
3.4.2. Grupo B	68
3.4.3. Grupo AB	70
3.4.4. Grupo O	73
3.5. Expresión de isoantígenos sanguíneos Lewis	75
3.5.1. Lewis <sup>a</sup>	75
3.5.2. Lewis <sup>b</sup>	80
3.5.3. Lewis <sup>x</sup>	85
3.5.4. Lewis <sup>y</sup>	88

## **IV. Discusión**

4.1. Análisis de los procedimientos técnicos utilizados	94
4.2. Características biológicas de los marcadores tumorales utilizados	104
4.2.1. Marcadores hormonales	104
4.2.2. Marcadores de proliferación celular	111
4.2.3. Antígenos de grupo sanguíneo	128
4.3. Análisis de los resultados	138
4.3.1. Receptores de hormonas esteroides	138
4.3.2. Marcadores de proliferación celular	141
4.3.3. Isoantígenos de grupo sanguíneo	145

## **V. Resumen y Conclusiones**

5.1. Resumen	155
5.2. Conclusiones	158

## **VI. Bibliografía**

Bibliografía	160
--------------	-----

---

# I. Introducción

## **I.-INTRODUCCIÓN**

El cáncer de mama es una de las causas más frecuente de muerte en los países industrializados y su incidencia está aumentando de forma constante y significativa en los últimos años.

La probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer ha pasado de ser de 1 de cada 20 mujeres hace 20 años a 1 de cada 11 en la actualidad <sup>(1)</sup>, por lo que comprensiblemente, el cáncer de mama ha sido objeto de una publicidad justificada y de intensos estudios respecto a sus orígenes, métodos diagnósticos y tratamiento.

### **1.1. ETIOLOGÍA DEL CARCINOMA DE MAMA**

Los datos epidemiológicos y los estudios de tumores mamarios in vitro y en animales de experimentación, apuntan a tres tipos de influencias que pueden ser importantes en el cáncer de mama: 1.- factores genéticos; 2.- desequilibrios hormonales y 3.- factores ambientales. En los animales de experimentación, además, las infecciones por virus pueden interaccionar claramente con estas influencias y causar cáncer pero, hasta la fecha, no se ha documentado una etiología viral en humanos.

- **Factores genéticos.-**

Uno de los pasos más prometedores para poder conocer las causas del cáncer de mama y poder establecer un programa de control efectivo de la enfermedad, es identificar mujeres que están genéticamente predispuestas a padecer la enfermedad.

La historia familiar de la enfermedad es el mayor factor de riesgo en el cáncer de mama. No es sorprendente, por tanto, que se hayan realizado tantos esfuerzos para identificar los loci que predisponen a este tipo de cáncer, y en último término, clonar los genes responsables de la enfermedad. La dificultad de esta tarea se ve incrementada por el hecho de que el cáncer de mama es una enfermedad genéticamente heterogénea, con genes que presentan más de un locus susceptible de contribuir a la predisposición hereditaria<sup>\*(2)</sup>.

Distintos estudios epidemiológicos sugieren que algunos de estos genes podrían conferir una susceptibilidad dominante en la herencia del cáncer de mama y se podrían introducir entre distintos transportadores génicos<sup>\*(2)</sup>.

Uno de los factores que podría obstaculizar el aislamiento de genes que predisponen a este tipo de tumores, es la elevada incidencia de la enfermedad en la población general y, el hecho, de que tan solo entre el 2-5% de los casos se debe claramente a una predisposición genética familiar<sup>\*(2)</sup>.

En las familias que se han descrito múltiples casos de cáncer de mama, la enfermedad suele presentarse en época premenopausica y, frecuentemente, aparece de forma

bilateral <sup>(3,4)</sup>. Tanto los hombres como las mujeres pueden ser transportadores de la enfermedad, pero, habitualmente, sólo las mujeres se ven afectadas por ella <sup>(5)</sup>. Se ha estimado que en algunas familias, las mujeres transportadoras de la enfermedad tienen un 80% de probabilidades de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida <sup>(6)</sup>.

Las alteraciones genéticas en los tumores pueden presentarse como cambios en el contenido total del DNA, en cromosomas individuales, en genes aislados o en la expresión génica.

La variación en el contenido de DNA es una medida del genoma imperfecta, pero efectiva. Muchos investigadores proponen que la diploidía se asocia a un mejor curso clínico y a otros marcadores de buen pronóstico, mientras que el incremento de la ploidía indica una mayor progresión tumoral. El aumento de la ploidía y la medida de la proliferación celular se correlacionan con indicadores de pobre pronóstico <sup>(7)</sup>.

Los principales estudios retrospectivos han mostrado diferencias en la supervivencia asociada con la diploidía cuando se compara con tumores aneuploides <sup>(8,9)</sup>. Sin embargo, los datos publicados son contradictorios en cuanto a la correlación de los patrones de ploidía con el estadiaje de la enfermedad, la afectación de ganglios loco-regionales y la supervivencia a largo plazo. También se ha puesto de manifiesto que la medida de DNA no se ha aceptado plenamente como un indicador pronóstico independiente en el cáncer de mama <sup>(10)</sup>.

El valor del contenido de DNA en el diagnóstico tumoral se ve debilitado por la evidencia de los hallazgos de aneuploidía en lesiones benignas <sup>\*(11,12)</sup>, mientras que entre el 30-40% de todos los carcinomas invasivos son diploides. Los tumores indiferenciados también se asocian con un porcentaje aumentado de células con DNA en fase S del ciclo celular <sup>\*(13)</sup>. Los tumores diploides muestran un valor medio inferior para la fracción de la fase S que los tumores aneuploides (2,6% y 10,3% respectivamente) <sup>\*(14)</sup>.

Se ha sugerido que la fracción de la fase S pudiera ser un indicador pronóstico independiente de particular importancia en pacientes sin afectación ganglionar, puesto que los valores altos de la misma en los tumores diploides parece reducir la supervivencia a niveles aproximados a los de los tumores aneuploides <sup>\*(15)</sup>.

La controversia que rodea a los estudios del contenido de DNA sugiere que se necesitan otros parámetros adicionales para el examen del contenido del DNA celular.

El estudio de las alteraciones cromosómicas como marcadores del cáncer de mama no ha sido, hasta la fecha, demasiado fructífero. El mayor catálogo de anomalías cromosómicas comprende más de 100 ejemplos de cáncer de mama; sin embargo, poco más de 70 son tumores sólidos, y muchos de ellos corresponden a tumores metastásicos y no a tumores primarios <sup>\*(16)</sup>. Existe una gran diversidad en los cambios cromosómicos de estas neoplasias, aunque muchos de los cánceres primarios y cultivos celulares de tumores mamarios presentan células que no parecen mostrar alteraciones genéticas.

En cualquier caso, las principales alteraciones cromosómicas observadas son duplicación o reordenamiento, amplificación de regiones genómicas, y pérdida de la heterozigosis.

La implicación del cromosoma 1 por duplicación o reordenamiento es relativamente frecuente en los tumores sólidos y en las metástasis de origen mamario, pero las anomalías en este cromosoma también son frecuentes en otros tipos de tumores sólidos<sup>(17)</sup>.

Estudios más recientes continúan reflejando el éxito limitado en el análisis citogenético de los tumores primarios de mama y la necesidad de seguir investigando, con el fin de poder definir marcadores cromosómicos específicos del tejido mamario normal y tumoral<sup>(18)</sup>.

Por lo que se refiere a la amplificación de regiones genómicas, cabe destacar que son mutaciones dominantes asociadas a la activación o sobre-expresión de un gen diana localizado en la unidad amplificada<sup>(19)</sup>.

En el cáncer de mama se han detectado 3 regiones fundamentales de amplificación. La primera de ellas se sitúa en el cromosoma 8q, que contiene el proto-oncogen c-myc, y que se ve amplificado en el 32% de los tumores mamarios<sup>(20)</sup>. La segunda región cromosómica afectada, que se localiza en el 11q13, se encuentra amplificada en el 16% de los tumores; esta región es portadora de los proto-oncogenes int-2 y hst/K-FG, que son miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico<sup>(21,22)</sup>. La tercera región encontrada, que presenta amplificación en el 10% de los casos, se

localiza en el 17q y contiene el proto-oncogen c-erb B2, que pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico <sup>(23,24)</sup>.

La asociación entre la amplificación de genes específicos y la expresión de RNA o proteínas, sin embargo, no es siempre perfecta<sup>\*(25)</sup> y así, por ejemplo, se ha observado sobre-expresión de c-myc y de c-erb B2 en tumores primarios de mama en ausencia de amplificación génica. Una de las hipótesis barajadas para explicar este fenómeno contempla la posibilidad de que el tejido normal, que puede contaminar el material de la biopsia, enmascare la presencia de la amplificación génica en las células tumorales <sup>\*(26)</sup>.

Por otra parte, la pérdida de heterozigosidad (LOH) representa el tipo más frecuente de mutación en los tumores primarios de mama. La LOH parece suceder como consecuencia de deleciones intersticiales, pérdida de cromosomas o acontecimientos de recombinación mitótica aberrante, y es un hecho altamente frecuente en distintos tipos de neoplasias<sup>\*(27,28)</sup>. También se piensa que la LOH puede tener su origen en el enmascaramiento de genes supresores de tumores localizados en la región afectada en el correspondiente homólogo<sup>\*(29)</sup>.

El gen del retinoblastoma (RB-1), se ha contemplado como el paradigma de este tipo de genes. La inactivación del RB-1 puede suceder como consecuencia de dos mutaciones independientes. Frecuentemente, un alelo normal se pierde como resultado de la LOH, mientras que el otro alelo contiene una pequeña deleción o una mutación puntual que inactiva el producto génico<sup>\*(30)</sup>.

Sato y colaboradores han alelotipado un panel de carcinomas primarios de mama, y han encontrado que los cromosomas más frecuentemente afectados por la LOH son el 13q (21%), el 16q (38%), y el 17p (52%). La frecuencia de LOH en el otro brazo cromosómico fluctuaba entre el 0-19% <sup>(31)</sup>.

La baja frecuencia de LOH en algunos brazos cromosómicos se podría interpretar como una evidencia de alteraciones genéticas no específicas o "background", sufridas en la progresión tumoral. Los hallazgos de Sato son comparables a los obtenidos en estudios realizados en carcinomas colo-rectales y renales, en los que muchos brazos cromosómicos se ven afectados de forma variable en lo que se refiere a la pérdida de heterocigosidad <sup>(32,33)</sup>.

Por otra parte, Callahan y su grupo <sup>(34)</sup> han encontrado que la frecuencia de LOH varía significativamente y de forma ordenada entre los fragmentos de restricción de alto pleomorfismo (RFLP) en el mismo brazo cromosómico. Este tipo de patrón de LOH es consistente con la presencia de genes supresores de tumores cercanos al locus que presenta mayor frecuencia de pérdida de heterocigosidad.

Otro factor que podría afectar a la aparente frecuencia de mutaciones sería la heterogeneidad del tumor. Como ya comentamos en un apartado anterior, la heterogeneidad tumoral podría ser consecuencia de contaminación del tumor por células de tejido normal, que ocultarían la mutación particular <sup>(26)</sup>.

Actualmente, sin embargo, parece prematuro sacar cualquier conclusión definitiva en cuanto a que el gran número de regiones del genoma que se ven afectadas por la

LOH, sea consecuencia de la acumulación de mutaciones no específicas durante la progresión del tumor, o que por el contrario, refleje una selección progresiva de mutaciones que contribuyan a la progresión tumoral<sup>(35)</sup>.

Aunque todavía queda mucho por hacer en este campo, distintas observaciones sugieren que la complejidad de las mutaciones que contribuyen a la evolución del cáncer de mama debe ser muy elevada. Además, si la alta frecuencia de LOH en diferentes regiones del genoma es una consecuencia, más que una causa, en el desarrollo del cáncer mamario, parece lógico pensar, que las mutaciones sucedan independientemente unas de otras. Pero de hecho, se han encontrado 11 pares de mutaciones que aparecen conjuntamente, con una frecuencia estadísticamente significativa<sup>(36)</sup>.

En base a estos hallazgos, según el grupo de Callahan<sup>(34)</sup> se podrían distinguir dos subgrupos de tumores: el primero presentaría frecuentemente LOH en los cromosomas 11p, 17p y 18q; en el segundo grupo los cromosomas más frecuentemente afectados serían el 1p, 13q y 18q. Estos hallazgos también se han observado en otros estudios de carcinomas de mama, colon y pulmón<sup>(31,37,38,39,40)</sup>. Todos estos datos juntos, sugieren que, en función de la historia y del estatus fisiológico de los pacientes, se podrían seleccionar grupos de mutaciones que actuaran en colaboración durante la progresión tumoral.<sup>(34)</sup>

Hasta nuestros días, sólo se han identificado dos de los posibles genes supresores de tumores dianas de la LOH en los carcinomas de mama. Se cree que ambos están implicados en la supresión de la proliferación celular normal durante el desarrollo. El

blanco para la LOH en el cromosoma 13q parece ser el gen del retinoblastoma RB-1, el cual, codifica para una fosfoproteína nuclear con capacidad de unión al DNA<sup>(30,41,42,43)</sup>. En el cromosoma 17p, el gen p53 parece ser la diana de la pérdida de heterocigosidad. Distintos grupos han encontrado que entre el 10 y el 46% de los tumores primarios de mama contienen mutaciones puntuales en este gen<sup>(44,45,46)</sup>. El p53 también codifica una fosfoproteína nuclear con capacidad de unión al DNA, que es capaz de activar la transcripción<sup>(47,48)</sup>.

A pesar de los esfuerzos realizados por distintos laboratorios para determinar la potencial utilidad clínica de las mutaciones o de sus productos, como indicadores del curso de la enfermedad tumoral, el problema continúa sin solución definitiva<sup>(49,50)</sup>, ya que existen diferencias substanciales entre los grupos de investigación en lo que se refiere a la metodología y el análisis de los resultados. Sin embargo, y a pesar de los problemas existentes en la actualidad, este campo representa una gran promesa para el desarrollo de nuevos indicadores pronósticos de utilidad para la determinación del comportamiento de la enfermedad.

- **Factores hormonales.-**

El desequilibrio hormonal desempeña claramente un papel significativo en los tumores mamarios <sup>(51)</sup>. Muchos factores de riesgo asociados al cáncer de mama (larga duración de la vida reproductiva, nuliparidad y edad tardía al tener el primer hijo) implican un aumento de la exposición a picos de estrógenos durante el ciclo menstrual; por otra parte, la respuesta de los tumores de mama a la manipulación hormonal es

conocida desde que se publicaron los primeros experimentos de castración a finales del siglo pasado.<sup>\*(52)</sup>

Las bases moleculares para esta sensibilidad fueron demostradas en 1971, encontrándose que ciertas proteínas intracelulares estaban presentes en los tejidos hormono-dependientes que específicamente unían estrógenos y que podrían ser utilizadas para identificar cánceres de mama hormono-sensibles.<sup>\*(51)</sup> Las investigaciones posteriores del proceso celular involucrado sugerían, que la proteína receptora de estrógenos citoplásmica probablemente se localizaba en la membrana nuclear. Los estrógenos provenientes de la circulación, y otras hormonas esteroides entran libremente en la célula, y cuando esto sucede, se unen al receptor de estrógenos. Este complejo se transloca entonces dentro del núcleo donde estimula al DNA para iniciar síntesis de proteínas, crecimiento y proliferación celular. Entre las proteínas sintetizadas en respuesta a la estimulación estrogénica, se encuentra la proteína receptora de progesterona, que atrapa y procesa a la progesterona circulante de forma similar al receptor de estrógenos. La presencia de ambos receptores es una evidencia adicional de que el mecanismo celular para el procesamiento de estrógenos se encuentra intacto en las células <sup>\*(50)</sup>.

El epitelio mamario normal posee receptores para estrógenos y progesterona, y estos receptores han sido identificados en algunos cánceres de mama pero no en todos. Diversos promotores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante alfa, el factor de crecimiento epidérmico, el de plaquetas o el fibroblástico, así como factores inhibidores del crecimiento, son segregados por las células neoplásicas en el cáncer de mama humano, y muchos estudios sugieren que participan en un

mecanismo autocrino de progresión tumoral. La producción de estos factores depende de los niveles de estrógenos y, se piensa, que en la progresión del cáncer de mama están implicadas interacciones entre las hormonas circulantes, receptores hormonales en las células transformadas y factores autocrinos de crecimiento inducidos por las células tumorales. <sup>(53, 54)</sup>

La presencia de receptores para estrógeno y progesterona en las pacientes con cáncer de mama se correlaciona positivamente con un intervalo libre de enfermedad superior y con una probabilidad mayor de respuesta a la terapia endocrina. Las pacientes que presentan tumores con receptores para estrógenos responden favorablemente a la terapia hormonal en un 60% de los casos aproximadamente, mientras que esta cifra puede llegar hasta el 70-80% si ambos receptores son positivos <sup>(55,56,57)</sup>.

La positividad para estos receptores también se asocia con varios acontecimientos celulares, histológicos y cinéticos que sugieren un pronóstico más favorable, y así, los tumores RE positivos parecen ser mejor diferenciados, mostrar un mejor grado nuclear y no presentar necrosis <sup>(248)</sup>. Además, este tipo de tumores también parece estar relacionado con una menor actividad proliferativa y tienden a presentar un contenido genético diploide <sup>(14)</sup>. Como indicador pronóstico, el status del RE parece ser independiente de otros elementos que contribuyen al estadio clínico y patológico, y en muchos estudios no se ha encontrado ninguna correlación con el estadiaje clínico TNM <sup>(249,256)</sup>.

Resumiendo lo anteriormente expuesto, se podría decir que la determinación del estatus de los receptores de estrógenos y progesterona es una información importante

para seleccionar grupos de pacientes susceptibles a tratamiento hormonal y es relevante como factor pronóstico. El curso más favorable de las pacientes con tumores que contienen estos receptores parece derivar tanto de los efectos favorables de la terapia endocrina como de una biología tumoral menos agresiva, aunque también parece evidente, que este hecho tiende a reducirse con el tiempo.

- **Factores ambientales.-**

La incidencia variable de cáncer de mama en grupos homogéneos genéticamente y las diferencias geográficas de incidencia, sugieren la existencia de influencias ambientales<sup>\*(58)</sup>. Hace unos años se quiso involucrar a ciertos componentes dietéticos en el desarrollo de estos tumores, pero actualmente se cuestiona esta hipótesis.<sup>\*(59)</sup>

- **Infecciones víricas.-**

La contribución de los virus a este tipo de neoplasias ha sido perseguido desde el descubrimiento de Bittner en 1936 de un agente filtrable, transmitido por la leche materna, que causaba cáncer de mama en ratones lactantes; el virus, denominado virus del tumor mamario del ratón (MMTV) fue identificado posteriormente como un retrovirus<sup>\*(60)</sup>. Desde entonces ha habido un gran interés en identificar un virus análogo en un humanos y en aislar antígenos relacionados con virus en el cáncer de mama.

En 1979, Black y su equipo utilizaron el test de inhibición de migración linfocitaria (LMI) contra el MMTV gp55 y encontraron que aunque no era útil para el screening o el diagnóstico, las respuestas positivas al gp55 eran pronósticamente favorables cuando se asociaban a respuestas negativas al cáncer de mama autólogo<sup>(61)</sup>. Por otra parte, McCoy y su grupo, utilizando un test LMI indirecto, encontraron que del 50 al 60% de las mujeres con cáncer de mama eran reactivas al MMTV y al antígeno gp52 del virus, y que, además, entre el 30 y 40% de las mujeres con lesiones benignas de mama también reaccionaban con el MMTV. Los resultados demostraban que el factor reactivo era el factor inhibidor de leucocitos (LIF) y que algunas pacientes tanto con lesiones benignas como malignas de mama producían LIF para MMTV y gp52 en concentraciones elevadas <sup>(62)</sup>

Por otra parte, Wanebo y Fukuda, utilizaron también este test para investigar la posible relación entre el cáncer de mama en humanos y el MTV y el virus de Mason Pfizer en simios (MPMV), y encontraron que las pacientes con cáncer de mama mostraban respuestas significativas (49%) al MTV, y a la línea de cultivo celular de cáncer de mama MCF-7 (50%), pero no lo hacían para el MPMV (29%) <sup>(63,64)</sup>

Aunque estos estudios son de interés, sería útil, para el estudio más completo de las proteínas inducidas por estos virus, el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra secuencias de fragmentos antigénicos, y complementarlos con técnicas de hibridación utilizadas actualmente de manera rutinaria, en la detección de antígenos vírales.

Por lo que se refiere a la incidencia de los distintos tipos histológicos del cáncer de mama, hay que señalar, que el carcinoma ductal infiltrante no específico, es el más frecuente y supone del 65 al 80% de todos los cánceres mamarios, seguido muy de lejos por el medular o el lobulillar (2-14 y 5% respectivamente).

## 1.2. TERAPÉUTICA

El tratamiento del cáncer de mama continúa siendo un importante desafío para la Medicina, y aunque se dispone de una información cada vez más amplia sobre la biología tumoral, factores pronósticos, métodos diagnósticos, y a pesar de la incorporación de nuevos esquemas quimiohormonoterapéuticos, no se ha conseguido disminuir de manera ostensible su mortalidad.

Desde que Volkman (1875) presentara resultados superiores a los habituales de su época con la ablación de la mama, la exéresis ganglionar axilar y la fascia pectoral mayor, la conducta terapéutica fue orientada en sentido quirúrgico. Por otro lado, la mastectomía radical desarrollada por Halsted y Meyer en 1894, ha constituido la base del tratamiento durante todo lo que va de siglo, y además, las modificaciones de mayor o menor radicalidad quirúrgica no han dado los resultados esperados <sup>\*(65)</sup>

La radioterapia, utilizada tanto de forma complementaria a la cirugía, como de forma primaria en el cáncer de mama, tampoco ha supuesto el control de la enfermedad loco-regional ni el aumento de la supervivencia. <sup>\*(66)</sup>

La evidencia de que la cirugía por sí sola no era capaz de controlar la enfermedad, ni la radioterapia aportaba soluciones definitivas, hizo que en 1958 se iniciara el primer estudio aleatorio del tratamiento coadyuvante en el cáncer de mama, dentro de un nuevo concepto sistémico de la enfermedad.<sup>\*(65)</sup>

De manera resumida se puede decir, que el tratamiento hormonal adjuvante conduce a una disminución de la mortalidad en el 16% de los casos aproximadamente y a una disminución del riesgo anual de recidivas en el 30% de las pacientes. Además, los beneficios de este tipo de terapia son superiores en la supervivencia global de pacientes mayores de 50 años que en mujeres jóvenes, lográndose un mayor porcentaje de respuesta en tratamientos de dos años de duración o más, frente a un menor tiempo de tratamiento. Con los antiestrogénicos se evidencia una respuesta mejor, aunque no significativa, en relación con la concentración de receptores de estrógenos <sup>\*(67,68)</sup>

El uso de la quimioterapia se ha demostrado útil para alargar la supervivencia global de las pacientes. Desde que Cooper publicara en 1969 su régimen de poliquimioterapia con una tasa de respuesta del 90% han sido numerosos los trabajos y las modificaciones realizadas respecto a este tipo de terapia.<sup>\*(69,70)</sup>

Desde los años 60 y hasta los 80, se desarrollaron nuevos métodos terapéuticos y se ensayaron modificaciones a la mastectomía radical de Halsted, con unos resultados que actualmente tienen una consistencia dudosa, pues los tratamientos adjuvantes no permiten una valoración aislada de las mismas.<sup>\*(71, 72)</sup>

Los nuevos indicadores pronósticos y las distintas terapias que se desarrollaron en los años 80 continúan aumentando en los 90. Las variaciones en las opciones del tratamiento impulsan a una clasificación de los tumores de mama que aporte más ayuda en la elección terapéutica.

### 1.3. FACTORES PRONÓSTICOS

El ensayo de marcadores pronósticos, y su validación final, es un proceso largo y laborioso que crea especiales problemas cuando se tiene en cuenta que las tentativas terapéuticas no se han basado en ningún parámetro pronóstico excepto la afectación ganglionar y el estatus de los receptores hormonales.

El estudio de los factores pronósticos en el cáncer de mama se ha vuelto cada vez más complejo. Conforme crece el número de tales factores también se ha vuelto más difícil precisar su importancia relativa y su exactitud pronóstica. Los problemas previstos en este terreno de expansión rápida son los resultados antagónicos publicados por investigadores respetados, y la falta de estandarización de nuevas técnicas y metodologías. Sin embargo, y a pesar de todo, en la actualidad disponemos de marcadores que han sido ampliamente validados y de otros que ofrecen sólidas expectativas.

Dentro del primer grupo, cabría destacar la determinación del estatus de los receptores de hormonas esteroideas y la actividad proliferativa, puesto que han demostrado ser unos indicadores eficaces y ampliamente aceptados en el pronóstico a corto plazo<sup>(71)</sup>.

La presencia de receptores para estrógenos y progesterona en los cánceres de mama como ya dijimos anteriormente, se correlaciona positivamente con un intervalo libre de enfermedad mayor y con un incremento de la posibilidad de respuesta a la terapia endocrina, de tal manera, que si ambos receptores son positivos, la probabilidad de respuesta favorable al tratamiento representa del 75-80% <sup>(55)</sup>.

En el caso de mujeres sin afectación ganglionar, el estado de los receptores de estrógenos asume un papel muy importante como factor pronóstico, y distintos grupos sugieren que el estado de los receptores de estrógenos junto con el tamaño del tumor constituyen factores pronósticos independientes en tumores en estadio I <sup>(72)</sup>.

El estado de los receptores de progesterona parece ser un indicador más importante para predecir la supervivencia cuando la enfermedad alcanza el estadio II <sup>(73)</sup> y en mujeres con positividad de ganglios linfáticos, el estado de los receptores de progesterona parece tener tanta importancia como el número de ganglios afectados, para predecir la recurrencia <sup>(74)</sup>.

Además de su utilidad para predecir la supervivencia en el cáncer primario y en la enfermedad recurrente, el efecto beneficioso de la positividad de los receptores de estrógeno y el estado de los de progesterona se ha demostrado en innumerables estudios de la reacción del cáncer a la hormonoterapia <sup>(75)</sup>. Con arreglo a las concentraciones de receptores, del 40-80% de las pacientes con enfermedad avanzada y presencia de receptores se beneficiarán de la terapia hormonal. Las mujeres con tumores que poseen receptores de estrógeno y de progesterona son las que muestran el índice mejor de respuesta, en tanto que las que tienen sólo positividad de un receptor

mostrarían una respuesta intermedia <sup>(76)</sup>. Las pacientes sin receptores manifiestan una tasa de reacción menor de 10% a la homonoterapia, por lo que cabe ahorrarles las hipotéticas complicaciones del tratamiento, y en lugar de él utilizar citotóxicos en caso de cáncer avanzado.

Por lo que se refiere a la actividad proliferativa, parece intuitivo pensar que un tumor que se divide rápidamente será más agresivo que el que prolifera con más lentitud. La capacidad de división de las células tumorales para dividirse no predice por sí misma la posibilidad de metástasis y un ejemplo lo constituye el carcinoma medular de mama, en el que se observan numerosas mitosis, pero tiene un pronóstico más favorable que otros, al menos aparentemente. En general, sin embargo, en oncología se acepta el axioma que el índice de proliferación varía inversamente con el buen término de la enfermedad <sup>(77)</sup>.

La fracción de crecimiento, o el número de células en ciclo, puede ser determinada por distintos métodos, y actualmente se considera que es un parámetro muy sensible y un indicador sumamente específico de mal pronóstico a corto plazo <sup>(78,79)</sup>.

#### 1.4. PERSPECTIVAS

La tendencia actual en la biología celular es el estudio de los mecanismos reguladores de las funciones celulares a través de moléculas específicas tanto estructurales como funcionales y que abarcarían factores de crecimiento y sus receptores, transportadores de membranas, sistemas del citoesqueleto, componentes de la superficie de las membranas, etc., más que los clásicos estudios enzimáticos.

Las principales moléculas involucradas en la regulación funcional se ven modificadas por dos grandes procesos químicos: la fosforilación y la glicosilación. Tradicionalmente, el mayor interés se ha centrado en el fosforilación ya que es un mecanismo esencial en la modulación de la función celular. Esta idea ha sido además reforzada por el hecho de que muchos genes transformados codifican fosfoproteínas, la mayoría kinasas, aunque la mayoría de las funciones de sus sustratos no hayan sido todavía identificadas <sup>(80)</sup>.

Por el contrario los cambios en la glicosilación habían despertado menor interés, sin embargo, los cambios en la glicosilación suceden de una forma tan rápida y dramática como los procesos de fosforilación en distintos estadios de la diferenciación, desarrollo y oncogénesis <sup>(81)</sup>.

Mientras que los patrones de fosforilación son pocos, los patrones de glicosilación son numerosos, y se han podido caracterizar alrededor de 100 tipos de estructuras glicosiladas unidas a lípidos y también se han encontrado variaciones en la glicosilación de proteínas <sup>(82,83)</sup>.

En contraste con la fosforilación que modula directamente la función proteica, la glicosilación afecta a la conformación, localización y organización de las proteínas funcionales o estructurales <sup>(84)</sup>.

Los hidratos de carbono son los principales componentes de la cara externa celular de los mamíferos y a menudo son característicos de un determinado tipo celular. Durante los distintos estadios del desarrollo, se expresan grupos específicos de estas macromoléculas y, en muchos casos, son reconocidos por anticuerpos específicos, lo que

les confiere la característica de antígenos de diferenciación.<sup>\*(81)</sup> En los organismos maduros, la expresión de los distintos hidratos de carbono está eventualmente restringida a tipos celulares específicos, y las aberraciones en estos componentes de la membrana externa celular se asocia a varias condiciones patológicas, incluyendo la transformación maligna.<sup>\*(81)</sup>

Actualmente se asume que los carbohidratos específicos de tipo celular están involucrados en la interacción célula-célula, en concreto como moléculas que son reconocidas por proteínas que pueden unirse a ellos. También es posible que la diversidad de las estructuras de los hidratos de carbono actúen como señales específicas y que puedan ser reconocidas por receptores concretos. De la misma manera, también cabe pensar que la alteración en estos componentes celulares de lugar a células con moléculas diferentes a las que debieran ser reconocidas, proceso que es esencial durante la diferenciación, cuando unas células interaccionan con otras.<sup>\*(82)</sup>

De manera similar, las alteraciones de los hidratos de carbono en la transformación maligna, facilitaría a las células tumorales su interacción con otras células, lo que provocaría la colonización tumoral y la metástasis<sup>\*(82)</sup>.

Las células oncogénicamente transformadas in vitro, o aisladas de tumores in vivo, muestran inequívocamente distintos perfiles y estructuras en los hidratos de carbono de los que presentaban sus células progenitoras no transformadas. Los cambios en la estructura de estas moléculas en las células tumorales es esencialmente cuantitativa más que cualitativa. Sin embargo, los patrones de organización de los hidratos de carbono en la superficie celular de las células tumorales pueden ser tan diferentes a los

de las células no transformadas, que pueden ser reconocidos por métodos inmunológicos como antígenos asociados a tumores.<sup>\*(83)</sup>

Aunque el significado biológico de estos cambios dista mucho de ser conocido con exactitud, parece reflejar una interrupción en el desarrollo o en el programa de diferenciación <sup>\*(84)</sup>.

Los procedimientos para identificar los hidratos de carbono asociados a tumores incluyen por una parte la caracterización química de su composición y su estructura y en segundo lugar la producción de anticuerpos que reconozcan las estructuras anómalas encontradas.

Este sistema ha sido el procedimiento clásico para determinar muchos antígenos glicolipídicos en animales de experimentación y en algunos cánceres humanos <sup>\*(397,398)</sup>.

El segundo procedimiento utilizado para identificar estas moléculas se ha desarrollado a partir de las observaciones más recientes de que muchos anticuerpos monoclonales específicos de tumores reconocen antígenos carbohidratados, y así se han identificado un buen número de glicolípidos en distintos cánceres humanos <sup>\*(87)</sup>. Este procedimiento, sin embargo, no siempre reconoce el único antígeno que puede presentar la nueva estructura.

Los dos grupos principales de hidratos de carbono que muestran cambios en las células transformadas o en las células cancerosas son los glicolípidos y las glicoproteínas. Las alteraciones más frecuentemente encontradas en los glicolípidos son: 1) bloqueo en la biosíntesis con o sin acumulación de precursores, 2) neosíntesis debida a la activación de glicosiltransferasas que parecen estar inactivadas en las células progenitoras no

transformadas y 3) cambios en la organización de los glicolípidos en la superficie celular <sup>\*(87)</sup>. Así pues, las células tumorales se caracterizan por la acumulación de precursores glicolipídicos o "neoglicolípidos" que están altamente expuestos en la superficie celular y que se pueden reconocer por métodos inmunohistoquímicos como antígenos específicos asociados a tumores.

Por lo que se refiere a las glicoproteínas, los principales cambios observados son: 1) presencia de glicopéptidos con oligosacáridos unidos a asparagina que presentan un peso molecular superior al de las correspondientes fracciones aisladas de las células progenitoras no transformadas, 2) incremento de las estructuras o-glicosiladas tipo mucina y 3) presencia en la región periférica de las cadenas laterales de estructuras O o N-glicosiladas que muestran síntesis incompleta o neosíntesis similar a la encontrada en los glicolípidos <sup>\*(357)</sup>.

Por otra parte, y aunque las expectativas parecen prometedoras, todavía no se ha podido demostrar una correlación directa entre la glicosilación anómala y la expresión oncogénica, sin embargo, estos cambios en los hidratos de carbono podrían ser la consecuencia de una serie de mecanismos en cascada ocurridos tras la activación de un oncogen <sup>\*(399)</sup>.

Además, y como ya apuntamos en un apartado anterior, la glicosilación anómala parece estar íntimamente ligada al poder metastásico de las células tumorales <sup>\*(80)</sup>. El proceso de metástasis tumoral recuerda al proceso de actuación de los leucocitos en las lesiones inflamatorias, y de hecho, se ha encontrado que muchas células cancerosas tienen incrementados los niveles de sialil-Le<sup>x</sup> y sialil-Le<sup>a</sup>, estructuras que son ligandos para la E-

selectina <sup>\*(400,401)</sup>. También se sabe que las células tumorales están unidas a plaquetas formando una aglutinación de células tumorales rodeadas de estos elementos <sup>\*(402)</sup>. Estos agregados podrían ser atrapados fácilmente por los capilares donde las células tumorales liberarían citoquinas que activarían las células endoteliales. Una vez activadas estas células, las células tumorales se unirían a la E-selectina, y posiblemente a la P-selectina, expresadas en las células endoteliales. La unión a las selectinas en las células endoteliales conduciría a una unión estable con las células endoteliales y la eventual extravasación. Este proceso explicaría el crecimiento tumoral en los lugares de las metástasis <sup>\*(402)</sup>.

Por lo que se refiere al papel de los hidratos de carbono en la diferenciación y desarrollo hay que decir que la diferenciación embriológica o histogénica es un proceso ordenado de interacciones celulares a través de continuos cambios en las moléculas de la superficie celular codificadas por el programa genético <sup>\*(81)</sup>.

Los cambios en las moléculas de la superficie celular durante el desarrollo embrionario han sido detectados por métodos inmunológicos y estas moléculas se han descrito como antígenos de diferenciación, entre los que se incluyen los antígenos de grupo sanguíneo ABH, Forssman, li, etc. En cada caso, se observó que las moléculas antigénicas eran glicoesfingolípidos o la porción carbohidratada de las glicoproteínas, y que además, se expresaban en estadios concretos del desarrollo embrionario <sup>\*(81)</sup>.

En distintos tipos tumorales, y especialmente en los de origen epitelial, existen muchos de estos antígenos carbohidratados, y actualmente, parece claro que forman parte de los denominados antígenos relacionados con los grupos histosanguíneos y grupo Lewis y

además, han podido ser demostrados en cánceres de distintos orígenes mediante técnicas inmunohistoquímicas <sup>\*(85,86,87)</sup>.

Los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH y antígenos relacionados, se localizan en la porción terminal de las cadenas de los hidratos de carbono de las glicoproteínas y glicolípidos <sup>\*(88,89,90)</sup>. Estos antígenos están ampliamente distribuidos en el hombre y en otros grupos animales, especialmente en los tejidos epiteliales y en sus secreciones.

Estudios filogenéticos recientes, demuestran que los antígenos ABH aparecen más tempranamente en los tejidos provenientes del ecto y endodermo que en los que derivan del tejido mesenquimal hematopoyético en la evolución de los vertebrados <sup>\*(91)</sup>, y que la expresión de estos antígenos en los eritrocitos y en las células endoteliales solo aparece en humanos y primates superiores <sup>\*(92,93,94)</sup>. Por esta razón, el término "antígeno de grupo sanguíneo" no sería el más apropiado y desde 1989 se utiliza preferentemente el de "antígenos de grupo histosanguíneo", propuesto por Clausen y Hakomori para referirnos a los antígenos ABH, Lewis y otros antígenos relacionados. <sup>\*(95)</sup>

### 1.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La presencia universal de los antígenos histosanguíneos en los vertebrados hace pensar en la importancia de estas moléculas, aunque su papel fisiológico no haya sido esclarecido en su totalidad.

La creencia de que los patrones de distribución de estas macromoléculas en los tejidos normales y en los tumorales tuviera una gran importancia viene de mucho tiempo atrás, y podemos encontrar publicaciones, como la de Thomsen, fechada en 1930.<sup>\*(96)</sup>

Posteriormente, la glicosilación anómala ha sido ampliamente estudiada y está suficientemente documentada en tumores de vejiga urinaria, pulmón, colon, tumores gástricos etc.<sup>\*(97,98,99)</sup>. El fenómeno común encontrado en todos ellos ha sido la pérdida parcial o total de la expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo y en algunos casos se ha llegado a establecer una relación entre la pérdida de expresión y la potencial malignidad del tumor.

Por lo que se refiere al cáncer de mama, existen muy pocos estudios que se hagan eco de la repercusión de la expresión anómala de estos antígenos y de su potencial utilidad tanto en el curso clínico de la enfermedad como en el terreno pronóstico en este tipo de tumores. La escasa literatura encontrada al respecto coincide, como en otros tipos tumorales, en señalar una pérdida de expresión de los grupos sanguíneos ABH y Lewis en el tejido tumoral, respecto al tejido mamario normal en un porcentaje variable de casos.

Respecto a la relación que pudiera existir entre la expresión anómala de estos compuestos y otros factores pronósticos de utilidad aceptada ampliamente en estos tumores, todavía se disponen de menos estudios, y las publicaciones aparecidas tan sólo hacen referencia al estatus de los receptores hormonales, siendo además los resultados obtenidos por los distintos grupos contradictorios en muchos casos.<sup>\*(100)</sup>

Estos dos últimos hechos son los que han motivado este estudio bajo la hipótesis de que el carcinoma ductal inespecífico de mama se ve afectado por los fenómenos de glicosilación anómala y que los cambios en los patrones de expresión de los histogrupos sanguíneos guardan relación con distintos factores de interés pronóstico en este tipo de tumores.

### 1.6. OBJETIVOS

La presencia de antígenos consolidados asociados a tumores, que además se pueden definir por anticuerpos monoclonales, es sin lugar a dudas, uno de los principales avances en la inmunología tumoral y su aplicación diagnóstica ha sido, al menos parcialmente, reconocida.

Existe una gran cantidad de antígenos carbohidratados asociados a tumores que pueden tener utilidad en el diagnóstico histológico de distintos tipos tumorales y algunos, además, se pueden utilizar en el diagnóstico de lesiones premalignas.

Estas expectativas junto con la elevada incidencia del cáncer de mama y la mortalidad a la que da lugar es lo que nos ha motivado a realizar este trabajo, fijándonos como objetivos:

1. Determinar la frecuencia de la pérdida de expresión de los isoantígenos ABH y Lewis en los carcinomas ductales infiltrantes de mama.

2. Estudiar si existe algún tipo de relación entre la pérdida de expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo y las variables histológicas plenamente establecidas.
  
3. Estudiar si existe alguna relación entre la glicosilación aberrante en el carcinoma ductal de mama y otros marcadores de utilidad pronóstica demostrada en este tipo de tumores.

---

## **II. Material y Métodos**

## **II.-MATERIAL Y METODOS.**

Dentro de este apartado se estudian separadamente las técnicas de obtención de material, fijación y procesamiento básico, las técnicas de demostración de los antígenos tumorales e isoantígenos de grupos sanguíneos, las características de los anticuerpos utilizados y las técnicas de valoración de los resultados.

### **2.1.OBTENCION DEL MATERIAL, FIJACION Y PROCESAMIENTO BASICO.**

En este trabajo se estudian un total de 88 piezas quirúrgicas diagnosticadas histológicamente como carcinomas ductales infiltrantes mamarios de tipo no específico.

Las piezas fueron remitidas rápidamente al Laboratorio de Anatomía Patológica y cortadas en pequeños fragmentos de aproximadamente 2x1x0,5 cms. que se fijaron durante 2 horas en Líquido de Carnoy (etanol, cloroformo y ácido acético glacial en proporciones 6:3:1). Posteriormente los fragmentos fueron incluidos manualmente en parafina y cortados de manera seriada en secciones de 4 micras de grosor.

Los cortes de control se tiñeron con la técnica habitual de Hematoxilina-Eosina.

## **2.2.DEMOSTRACION DE ANTIGENOS TUMORALES.**

Para este estudio se utilizaron 4 anticuerpos monoclonales que se agruparon en 2 categorías:

- a) anticuerpos para la demostración de receptores de hormonas esteroides.
- b) anticuerpos para la demostración de proliferación celular.

### **a) Anticuerpos para la demostración de hormonas esteroides.**

En esta clase se incluyeron 2 anticuerpos, uno para la demostración del receptor de estrogénos (Laboratorios Immunotech S.A. 130,av.de Lattre de Tassigny B.P.177,13276 Marseille Cedex 9-France) y uno para la demostración del receptor de progesterona (Laboratorios BioGenex 4600 Norris Canyon Road San Ramon,CA 94583).

### **b) Anticuerpos para la demostración de proliferación celular.**

En este apartado se incluyeron 2 anticuerpos diferentes: PCNA (Laboratorios Novocastra Ltd., 24 Claremont Place, Newcastle upon Tyne NE 2 4AA.UK) y Ki-67(MIB-1) (Laboratorios Immunotech S.A. 130,av.de Lattre de Tassigny B.P.177,13276 Marseille Cedex 9 -France). El primero de ellos se ha encontrado en todo el ciclo celular mientras que el segundo parece estar ausente en la fase Go.

### 2.3. Demostración de isoantígenos de grupos sanguíneos.

En esta categoría se estudiaron un total de 6 anticuerpos: 4 para la demostración de grupos Lewis (a,b,x,y), 1 para la demostración de grupo A y 1 para la demostración de grupo B.

Todos los anticuerpos de este grupo proceden de los Laboratorios Signet (180 Rustcraft Road Dedham, Massachusetts).

La especificidad, clon, clase de inmunoglobulina y Laboratorio de procedencia de todos los anticuerpos utilizados en este trabajo se resumen en la tabla I.

<b>TABLA I</b>				
<b>MoAb</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Clon</b>	<b>Ig</b>	<b>Laboratorio</b>
PCNA	Humana (nativa y mutante)	PC10	G2a	Novocastra
Ki67	Ag nuclear Ki67 (3459-395 Kd)	MIB-1	G1	Inmunotech
RE	Cadena polipep. de RE de 67 Kd	ER1-D5	G1	Inmunotech
PgR	R. de progesterona humana	PgR 1A6	G1	Bio Genex
BG-2	Grupo A (cadena tipo II)	T36	G3	Signet
BG-3	Grupo B (cadena tipo II)	CLCP-19	M	Signet
BG-5	Le <sup>a</sup> (cadena tipo II)	T174	G1	Signet
BG-6	Le <sup>b</sup> (cadena tipo II)	T218	M	Signet
BG-7	Le <sup>x</sup> (cadena tipo II)	P12	M	Signet
BG-8	Le <sup>y</sup> (cadena tipo II)	F3	M	Signet

El procedimiento inmunohistoquímico de tinción corresponde a las técnicas indirectas B-SA marcada con Fosfatasa Alcalina y al complejo Avidina-Biotina marcado con peroxidasa. Para la realización de estas técnicas se utilizaron el sistema supersensitivo StrAvigen (Laboratorios BioGenex, 4600 Norris Canyon Road, San Ramon, CA 94583) y el Kit ABC Vectastain (Laboratorios Vector, Burlingame, CA,USA) respectivamente.

**TECNICA B-SA MARCADA CON FOSFATASA ALCALINA:** La realización de esta técnica consta de los siguientes pasos:

- 1.- Desparafinación por inmersión sucesiva de los cortes en las siguientes soluciones: Xileno, dos pasos de 10 minutos cada uno; Etanol, dos pasos de 5 minutos cada uno; Alcohol de 96°, un paso de 5 minutos.
- 2.- Hidratación en agua corriente.
- 3.- Lavado en PBS (Buffer Fosfato-salino, Laboratorios Sigma) 5 minutos.
- 4.- Incubación con el anticuerpo monoclonal correspondiente durante una hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda, utilizado a la dilución previamente titulada.
- 5.- Lavado en tampon PBS durante 5 minutos.
- 6.- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado durante 30 minutos.
- 7.- Lavado en tampon PBS durante 5 minutos.
- 8.- Incubación con el complejo Avidina-Streptavidina-Fosfatasa alcalina durante 30 minutos.
- 9.- Lavado en tampon PBS durante 5 minutos.
- 10.- Incubación con el revelador 2Cl-1 Naftol durante 3 minutos.
- 11.- Lavado en agua bidestilada.
- 12.- Ligera tinción nuclear de contraste con Hematoxilina de Karazzi.
- 13.- Montaje de los cortes en medio acuoso.

**TECNICA POR MEDIO DEL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA:** La técnica realizada consta de los siguientes pasos:

- 1.- Desparafinación e hidratación de los cortes de manera idéntica a la descrita en la técnica anterior.
- 2.- Bloqueo de la peroxidasa endógena por medio de una solución de agua oxigenada en metanol al 5% durante 5 minutos.
- 3.- Incubación de los cortes en buffer citrato 0.1M en microondas en tres pasos de 3 minutos cada uno.
- 4.- Lavado en PBS durante 5 minutos.
- 5.- Incubación con suero bloqueador durante 10 minutos.
- 6.- Incubación con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y a la dilución óptima titulada previamente.
- 7.- Lavado en PBS durante 5 minutos.
- 8.- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado durante 30 minutos.
- 9.- Lavado en PBS durante 5 minutos.
- 10.- Incubación con el complejo Avidina-peroxidasa-biotina durante una hora.
- 11.- Lavado en PBS durante 5 minutos.
- 12.- Incubación con la solución reveladora de Diaminobencidina 3 minutos.
- 13.- Lavado en agua bidestilada.
- 14.- Ligera tinción de contraste con Hematoxilina de Karazzi.
- 15.- Lavado breve en agua corriente, deshidratación, aclaramiento, y montaje en medio permanente.

La dilución empleada para cada anticuerpo, la técnica utilizada y el patrón de distribución se resumen en la tabla II.

<b>TABLA II</b>			
<b>MoAb</b>	<b>Dilución</b>	<b>Técnica</b>	<b>Patrón de distribución</b>
RE	Prediluido	ABC+MO	Nuclear
PgR	Prediluido	B-SA+MO	Nuclear
Ki67	1:50	ABC+MO	Nuclear
PCNA	1:100	B-SA	Nuclear
BG-2	1:50	ABC	Citoplásmica y membranosa
BG-3	1:40	ABC	Citoplásmica y membranosa
BG-5	1:40	ABC	Citoplásmica y membranosa
BG-6	1:50	ABC	Citoplásmica y membranosa
BG-7	1:75	ABC	Citoplásmica y membranosa
BG-8	1:50	ABC	Citoplásmica y membranosa

ABC: Completo Avidina-Biotina; B-SA: Biotina-streptavidina amplificado; MO: Microondas.

## **2.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS.**

### ***2.4.1. Anticuerpos para la demostración de hormonas esteroideas.***

La presencia de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (Rpg) está correlacionada positivamente con un intervalo libre de enfermedad más largo y con un probable incremento de la respuesta a terapia endocrina <sup>\*(101)</sup>. Si el RE y Rpg son positivos, existe un probabilidad del 70-80% de respuesta favorable a este tipo de terapia <sup>\*(102,103)</sup>. Para

detectar la presencia de receptores de estrógenos y progesterona se han utilizado distintos métodos. Actualmente la técnica estándar para la medida de estos receptores es el resultado cuantitativo que se obtiene de análisis basados en la utilización de radioligandos unidos al citosol. Los estudios bioquímicos tradicionales que utilizan preparaciones citosólicas requieren cantidades relativamente grandes de tejido y no tienen en cuenta la heterogeneidad de la distribución de los receptores <sup>\*(104)</sup>. Puesto que en ocasiones es necesario incluir la totalidad del tumor en parafina para su diagnóstico definitivo, es imposible disponer siempre de una parte del material para realizar la evaluación del RE y Rpg en congelación mediante métodos bioquímicos.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales para receptores de estrógenos y progesterona ha permitido utilizar el análisis inmunoenzimático (EIA) para el estudio de material congelado y el análisis inmunocitoquímico (ICA) para el estudio de material fresco, congelado o embebido en parafina <sup>\*(105,106)</sup>. El análisis inmunocitoquímico presenta como ventaja sobre el inmunoenzimático que permite determinar la heterogeneidad en la distribución de los receptores incluso en biopsias de pequeño tamaño; como contrapartida, presenta la desventaja de no ser un método cuantitativo <sup>\*(107)</sup>. El procedimiento más habitual para la demostración del receptor de estrógenos y progesterona por medios inmunocitoquímicos ha sido sobre tejidos congelados. En los últimos años han aparecido distintos artículos que describen la detección de dichos receptores en tejidos fijados y embebidos en parafina <sup>\*(108,109)</sup>.

Aunque la demostración de receptores de estrógeno y progesterona en muestras embebidas en parafina es una práctica habitual en los Laboratorios de Anatomía Patológica, hay que tener en cuenta que el procesamiento de las biopsias puede dar lugar a falsos negativos. El método de recuperación de antígenos por medio de microondas para muestras embebidas en parafina descrito recientemente, permite

desenmascarar los determinantes antigénicos que hubieran podido quedar ocultos tras el proceso de fijación y obtener una tinción satisfactoria <sup>\*(110)</sup>.

El anticuerpo utilizado en este trabajo para la demostración del receptor de estrógenos (ER-1/D5) reacciona con un polipéptido de 67 Kd. de la cadena del receptor y es efectivo en parafina realizando un pretratamiento de las secciones en buffer citrato 0.1 M, pH 6 en microondas. El patrón de tinción obtenido es nuclear. La validez del anticuerpo está avalada por distintos autores que han correlacionado la expresión de RE en secciones tisulares embebidas en parafina y la concentración de éstos determinada por medios bioquímicos <sup>\*(111,112)</sup>.

El anticuerpo utilizado para la demostración del receptor de progesterona (PGR-1A6) reconoce específicamente el receptor nuclear de la progesterona humana en muestras fijadas y embebidas en parafina y también en muestras de tejido congelado. En el cáncer de mama, la tinción específica queda restringida al núcleo de las células transformadas y al epitelio hiperplásico no maligno. Se ha encontrado una tinción similar en secciones de útero humano; en este órgano el marcaje aparece en células epiteliales y del estroma del endometrio y en las células del músculo liso del miometrio <sup>\*(113,114)</sup>.

#### ***2.4.2. Anticuerpos para la demostración de proliferación celular***

##### ***2.4.2.1. anti Ki-67 (MIB-1)***

Se sabe desde hace mucho tiempo que el índice de proliferación de un tumor guarda relación con su curso clínico, es por esto que los histopatólogos han buscado la manera

de determinar este parámetro como un complemento al diagnóstico <sup>\*(78,79)</sup>. La práctica más común y la más establecida para determinar el índice de proliferación es el conteo de figuras mitóticas. Este método proporciona una información pronóstica útil en algunos tumores como leiomiomas o cistosarcoma phyllodes, pero no en otros, como pueden ser el carcinoma de cuello uterino o linfomas foliculares <sup>\*(115, 116, 117,118)</sup>. Además, el conteo de figuras mitóticas no es un método completamente seguro ni reproducible, ya que sólo refleja una parte del ciclo celular, la mitótica o fase M, y no indica la duración de dicha fase. Así por ejemplo, el conteo de mitosis en un carcinoma de células basales puede ser alto, pero esto se debe más a una fase M prolongada del ciclo celular que a un alto índice de proliferación de la lesión <sup>\*(119,120,121)</sup>

En la actualidad existen técnicas plenamente establecidas y seguras para medir el índice de crecimiento de un tumor. Estos métodos utilizan timidina tritiada, incorporación de bromodeoxiuridina o citometría de flujo, pero son difíciles de realizar, muy costosos y largos en su ejecución y no están al alcance de todos los Laboratorios <sup>\*(122,123,124)</sup>. Las técnicas inmunohistoquímicas, por el contrario, son fáciles de realizar y de uso habitual en la mayoría de los centros de trabajo <sup>\*(125)</sup>.

El anticuerpo más frecuentemente utilizado para determinar la proliferación celular por métodos inmunohistoquímicos es el Ki-67.

El anticuerpo monoclonal Ki-67 puede ser utilizado para estimar la fracción de crecimiento, es decir, el número de células en ciclo de tejidos normales, reactivos y neoplásicos. Actualmente existe gran cantidad de literatura que se refiere a este anticuerpo y se han realizado múltiples estudios para demostrar su potencial valor pronóstico. Este anticuerpo desarrollado por Gerdes en 1983, reconoce un antígeno nuclear que se expresa en todo el ciclo celular excepto en la fase G0 <sup>\*(126)</sup>. El gen que

codifica este antígeno fué localizado en el cromosoma 10 por Shonk en 1989 <sup>\*(127)</sup>. Dos años más tarde Fonastch confirmó estos hallazgos demostrando la localización del antígeno en el brazo largo del cromosoma 10(10q25) <sup>\*(128)</sup>. Al aislar cDNA se encontró una secuencia de 66bp con una alta homología (65-70%) en todos los fragmentos estudiados. Además, parecía evidente que estos 66bp repetitivos contenían la secuencia que codificaba el epitopo detectado por el anticuerpo monoclonal Ki-67 <sup>\*(129)</sup>.

La función exacta del antígeno Ki-67 aún permanece sin desvelar. Se sabe que la cantidad de antígeno presente en las células en proliferación varía a través del ciclo celular. Sasaki observó que la expresión antigénica aumentaba con la progresión del ciclo celular, elevándose en la segunda mitad de la fase S y alcanzando un máximo en G2 y M <sup>\*(130)</sup>. También Guillaud demostró este incremento de la expresión antigénica con la progresión del ciclo celular en líneas celulares normales y malignas <sup>\*(131)</sup>. Por otra parte Verheinjen y su grupo demostraron, utilizando citometría de flujo, que las células mitóticas eran las que exhibían mayor cantidad de antígeno <sup>\*(132)</sup>. Estos datos han sido corroborados por distintos autores en tanto que otros grupos de trabajo admiten la expresión uniforme del antígeno en todo el ciclo celular <sup>\*(133,134)</sup>.

Al igual que la expresión, la distribución topográfica del antígeno también parece ser dependiente del ciclo celular. En la fase G1 tardía se localiza en la región perinucleolar, en la fase S se detecta homogéneamente en el carioplasma y en la fase G2 la tinción presente en el carioplasma muestra un patrón finamente granular, en mácula y también se observa tinción perinucleolar. Durante la profase y metafase la tinción es pericromosómica además de carioplásmica en profase, y citoplásmica en metafase. La intensidad de tinción disminuye rápidamente en anafase y telofase <sup>\*(131,135)</sup>.

A pesar de todos estos datos y como ya comentamos anteriormente, la función del antígeno Ki-67 sigue sin conocerse en su totalidad. Braun propone que el antígeno pueda actuar como una molécula controladora del ciclo celular basándose en la propia cinética del Ki-67 <sup>\*(135)</sup>.

Por otra parte Fallini y colaboradores han demostrado que el antígeno se conserva en tejidos normales y neoplásicos en distintas especies animales (cordero, ternera, perro conejo y rata) y en el hombre, lo que indicaría su importancia en la regulación del ciclo celular <sup>\*(136)</sup>. En contraposición a estos datos Schonk y su grupo han detectado proliferación en algunas células híbridas carentes de antígeno, por lo que mantienen que el Ki-67 no es esencial para la proliferación celular <sup>\*(127)</sup>. Verjheijen apoya esta hipótesis al demostrar mediante citometría de flujo, células Ki-67 negativas que se encontraban en ciclo <sup>\*(132)</sup>.

Llegados a este punto conviene resaltar que existen distintos problemas prácticos que pueden limitar la efectividad del Ki-67 como indicador pronóstico, particularmente en biopsias pequeñas. La primera circunstancia que hay que tener en cuenta es que la expresión del antígeno parece estar influenciada por el aporte nutricional de las células <sup>\*(134)</sup>, y en segundo lugar, hay que considerar que muchos tumores están formados por poblaciones celulares heterogéneas entre las que existen diferentes grados de proliferación <sup>\*(137)</sup>.

Además de estas cuestiones prácticas, también existen consideraciones de carácter teórico: el grado de proliferación comprende dos parámetros, la fracción de crecimiento, demostrable por Ki-67, y el tiempo empleado por las células en completar el ciclo celular. Así, un tumor en el cual todas las células entrasen en ciclo a la vez pero que emplearan mucho tiempo en completarlo, mostraría una elevada positividad para Ki-67

aunque el grado de proliferación podría no ser muy grande. Por el contrario, un tumor en el que sólo una minoría de células estuviera en ciclo pero cuyo ciclo fuera muy corto, podría tener un grado de proliferación alto, aunque las células positivas para Ki-67 fuesen pocas. Así pues, hay que recordar que la expresión de Ki-67 sólo nos aporta información de si una célula está en ciclo o no, pero no aporta información respecto a la longitud del ciclo.

A pesar de todos los inconvenientes, la expresión de Ki-67 se utiliza como indicador de proliferación celular en distintas enfermedades como son tumores del sistema nervioso central, tumores del sistema conectivo, linfomas, carcinomas mamarios etc. <sup>\*(138,139,140,141,142,143,144,145)</sup>.

Por otra parte, no hay que olvidar que el material utilizado para la demostración del antígeno Ki-67 han sido tradicionalmente secciones tisulares congeladas en criostato, aunque también se han empleado preparaciones citológicas, hematológicas y aspirados por aguja fina <sup>\*(146,147,148)</sup>, puesto que el antígeno Ki-67 es extremadamente sensible a la desnaturalización química y es destruido por la fijación en formaldehído <sup>\*(149)</sup>.

En 1992 Cattoretti y colaboradores utilizando partes recombinantes del antígeno Ki-67 produjeron un anticuerpo monoclonal nuevo (MIB 1-3) capaz de reconocer al antígeno Ki-67 <sup>\*(150)</sup>. Este anticuerpo, utilizado en nuestro trabajo, es efectivo en secciones fijadas e incluidas en parafina. La demostración del antígeno Ki-67 con este nuevo anticuerpo monoclonal requiere un pretratamiento de las muestras en microondas con una solución de buffer citrato 0.1 M y pH 6.

Puesto que el anticuerpo MIB-1 era efectivo en muestras fijadas y embebidas en parafina y el anticuerpo Ki-67 no lo era, parecía razonable pensar que reconocían distintos epitopos del antígeno. Además, también parecía improbable que ambos anticuerpos tuvieran exactamente el mismo perfil inmunorreactivo, por lo que los resultados obtenidos deberían ser manejados con la máxima precaución. Trabajos posteriores parecen indicar que el anticuerpo MIB-1 reconoce el mismo epitopo o uno muy similar al reconocido por el anticuerpo original Ki-67 <sup>\*(151)</sup>, y en la práctica ha sustituido al anticuerpo original Ki-67 en el diagnóstico de rutina.

#### 2.4.2.2. anti-PCNA (PC10)

El antígeno nuclear de proliferación celular PCNA, es una proteína no histona de 36 Kd, asociada con la proliferación celular. Esta proteína fué detectada en experimentos en los cuales el suero de pacientes con Lupus Eritematoso no mostraba reactividad con células en reposo pero sí reaccionaban con el núcleo de células en división en tejidos normales y también con linfocitos periféricos de distintas líneas celulares estimulados mitogénicamente <sup>\*(152,153,154)</sup>. Miyachi y colaboradores denominaron a esta proteína antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) <sup>\*(154)</sup>.

Independientemente, Bravo y su equipo, buscando proteínas específicas para ciclo celular, identificaron una proteína nuclear acídica de 36 Kd que fué posteriormente denominada ciclina <sup>\*(155)</sup>. En 1984 Mathews y sus colaboradores demostraron que PCNA y ciclina eran idénticos <sup>\*(156)</sup>. Desde entonces se admite que el PCNA\Ciclina es una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta y su presencia parece ser necesaria para la replicación del DNA <sup>\*(157,158)</sup>.

La estructura del gen humano para el PCNA\Ciclina fué determinado por Travalí y su equipo y la proteína que codifica, un polipéptido de 261 residuos con un alto contenido en aspártico y glutámico, también ha sido secuenciada <sup>\*(159,160)</sup>. La proteína se sintetiza en el paso de G1 a S, tiene una vida media larga (20 horas) y es detectable en todo el ciclo celular. El PCNA existe al menos en dos formas, una estrechamente unida a los replisomas o a los sitios de reparación de DNA y una segunda distribuida difusamente por el nucleoplasma <sup>\*(161)</sup>.

El gen que codifica el PCNA ha sido clonado de distintas especies <sup>\*(160,162,163)</sup> y aunque existe variación a nivel de DNA, sólo hay 4 aminoácidos diferentes entre el PCNA humano y el de rata y alrededor del 7% de la proteína de *Drosophila* es idéntica a las proteínas humana y de rata. Además, mientras la secuencia del PCNA de levaduras muestra sólo un 35% de homología con el PCNA humano a nivel genético, las moléculas son funcionalmente intercambiables <sup>\*(164)</sup>. La conservación evolutiva del gen para PCNA en el reino animal y vegetal es completamente consistente con el hecho de que la proteína tiene un papel esencial en la replicación del DNA de eucariotas.

La regulación de la expresión del PCNA es compleja <sup>\*(164)</sup> y se cree que ocurre tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional <sup>\*(164,165,166)</sup>; incluso parece haber diferencias entre la regulación de las células quiescentes y las que están continuamente en ciclo <sup>\*(164,167)</sup>. En estas últimas hay muy poca variación en los niveles de proteína o mRNA durante el ciclo <sup>\*(164,167)</sup>. Aunque la región promotora del PCNA ya ha sido mapeada, su contribución al control transcripcional no se conoce todavía con exactitud <sup>\*(159,168)</sup>. La regulación de la expresión de PCNA por mecanismos post-transcripcionales parece ser muy importante al menos *in vitro* <sup>\*(164,169,170)</sup>. Se piensa que muchas células sintetizan continuamente PCNA mRNA, al menos a bajos niveles,

pero rápidamente le degradan sin que se haya transcrito. En consecuencia, las células son capaces de responder rápidamente, en las circunstancias correctas, a los factores de crecimiento induciendo la síntesis de PCNA por estabilización de su mRNA <sup>\*(164,169)</sup>.

Actualmente existen una gran variedad de anticuerpos que reconocen el PCNA. Los sueros comerciales incluyen los anticuerpos 19A2, 19F4 y PC10 <sup>\*(171,172,173)</sup>.

El anticuerpo monoclonal utilizado en nuestro trabajo, el PC10, y otros anticuerpos relacionados se han obtenido por inmunización de ratones con partes recombinantes del PCNA humano expresado en E.coli <sup>\*(172)</sup>. Se piensa que los epitopos reconocidos por estos anticuerpos son diferentes y que existen también diferencias en los efectos que producen la fijación y el procesamiento de las muestras en la detección de los epitopos <sup>\*(174)</sup>. Además, también parecen existir diferencias entre el desarrollo inmunológico de estos anticuerpos comparados con los autoanticuerpos humanos <sup>\*(174)</sup>; quizá sea ésta la explicación a las discrepancias observadas en las distintas publicaciones sobre la inmunorreactividad del PCNA y su relación con otros marcadores del ciclo celular. Por otra parte, las diferencias observadas entre los anticuerpos anti-PCNA pueden deberse a la distinta naturaleza física de los inmunógenos utilizados y en particular si se encontraban en su forma nativa, como los autoanticuerpos, o desnaturalizados, como el PC10 <sup>\*(174)</sup>. Sea cual fuere la explicación, es preciso tener en cuenta que los distintos anticuerpos deben tener propiedades diferentes incluso aunque reconozcan la misma proteína <sup>\*(172)</sup>.

Además de las diferencias entre los distintos anticuerpos que reconocen PCNA, todos los investigadores parecen estar de acuerdo en la importancia de los procedimientos técnicos empleados en la detección del antígeno, y en particular el proceso de fijación de las muestras parece ser el de mayor importancia, tanto en lo que se refiere a la

duración de la fijación, al tamaño de la pieza como a la elección del fijador <sup>\*(175)</sup>. Otro punto a tener en cuenta a la hora de trabajar con este anticuerpo, es el sistema inmunohistoquímico de detección utilizado, ya que la sensibilidad del método elegido puede variar los resultados debido a que los niveles de PCNA pueden ser muy bajos en función de la fase del ciclo en que nos encontremos <sup>\*(176)</sup>; por tanto, y en resumen, podemos concluir que el uso de anticuerpos para la demostración de PCNA como marcadores de proliferación celular no es sencillo ya que requiere un cuidadoso análisis de todos los parámetros anteriormente expuestos.

#### ***2.4.3. Anticuerpos para la demostración de isoantígenos sanguíneos.***

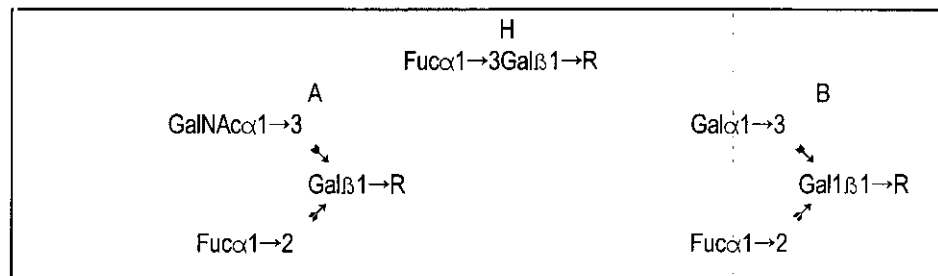
Los antígenos de grupo sanguíneo, los principales aloantígenos en humanos, están presentes en células sanguíneas y en varios tipos de células epiteliales. Puesto que la mayoría de los cánceres en el hombre derivan de este último tipo celular los cambios en dichos antígenos se convierten en un punto importante en la inmunología tumoral.

Las neoplasias están asociadas comunmente con modificaciones de una gran variedad de determinantes antigénicos de membrana plasmática que reflejan alteraciones en la diferenciación bioquímica <sup>\*(177,178)</sup>.

Los antígenos de grupo sanguíneo ABO son glicolípidos de membrana que se expresan en diferentes tipos de células epiteliales y su pérdida se ha descrito en carcinomas de distintos orígenes <sup>\*(104)</sup>. En algunos casos, además, existen datos que sugieren una correlación entre la delección de los isoantígenos ABO y el pronóstico <sup>\*(180,181)</sup>.

Los primeros estudios para determinar el estatus de los isoantígenos sanguíneos en distintos tejidos, tanto normales como neoplásicos, se realizaron utilizando los métodos de aglutinación, adherencia específica de glóbulos rojos, inmunofluorescencia y el método inmunohistoquímico de la peroxidasa-antiperoxidasa <sup>\*(181)</sup>. Para determinar correctamente la relación entre el estatus de los antígenos de grupo sanguíneo en las neoplasias y el desarrollo biológico de éstas es necesario utilizar técnicas sensibles y altamente específicas. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales, con mono-especificidad dirigida para determinantes antigénicos únicos, ha permitido la localización de antígenos que anteriormente no se habían podido demostrar <sup>\*(182,183)</sup>. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los isoantígenos sanguíneos A y B se han utilizado con éxito, por ejemplo, en la evaluación inmunohistoquímica de estos isoantígenos en carcinomas del epitelio de transición o gástricos <sup>\*(184,185)</sup>. En el caso de los carcinomas de mama existen pocos artículos que hagan referencia a la determinación de los isoantígenos sanguíneos y su posible utilidad pronóstica.

La caracterización bioquímica de los determinantes que definen las especificidades de los grupos sanguíneos ABO y antígenos Lewis fue llevada a cabo por Morgan, Watkins y Kabat en los años 50 <sup>\*(90,186)</sup>. Los trabajos posteriores de Khon, Isaki y Masaki y Ceppellini condujeron a la identificación del grupo H, los isoantígenos Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup> y a la formulación teórica de la relación precursor/producto en el grupo H y el A o el B <sup>\*(187,188,189,190,191)</sup>. Se pudo demostrar también que los determinantes antigénicos del sistema ABO eran oligosacáridos de L-fucosa, D-galactosa y D-N-acetilgalactosamina, con unas estructuras mínimas determinantes como la siguiente:



La naturaleza química de los antígenos de eritrocitos y otros tejidos no se pudo explicar hasta mediados de los años 60, cuando fueron identificados como una serie de glicoesfingolípidos o proteínas transmembrana que portaban el determinante antigénico con distintas estructuras esenciales o "core" <sup>\*(90,192)</sup>.

La expresión de antígenos A y B se cree que está controlada por genes alélicos o semialélicos localizados sobre el brazo largo del cromosoma 9 <sup>\*(90,193,194)</sup>. El fenotipo eritrocitario O se caracteriza por la ausencia de antígenos A y B y por la presencia de una mayor cantidad de antígeno H que en los eritrocitos A y B. La ruta biosintética de estos determinantes ha sido establecida y básicamente predice que un genotipo dominante induce una glicosiltransferasa la cual cataliza la adición de un monosacárido a un oligosacárido determinado con una especificidad concreta <sup>\*(195,196,197)</sup>.

Los individuos A y B codifican glicosiltransferasas ( $\alpha$ 3-Gal→NAc y  $\alpha$ -3-Gal respectivamente) capaces de convertir una estructura precursora (el antígeno H) en antígeno A y B por adición de N-acetilgalactosamina o galactosa. Los individuos del grupo O se cree que son homocigotos para un alelo silente o son portadores de un gen que da lugar a una proteína enzimáticamente inactiva <sup>\*(198,199,200)</sup>.

Las células de los individuos O sí expresan la estructura precursora, el antígeno H. Este precursor se genera por la acción de glucosiltransferasas codificadas por dos genes independientes el H y el Se, los cuales son "inactivos" en los individuos de fenotipo Bombay; en los individuos de fenotipo "para-Bombay" sólo el gen H es inactivo <sup>\*(91)</sup>.

El término "antígenos de grupo sanguíneo" se ha aplicado a los grupos ABH(O) y antígenos relacionados, pero constituyen los principales antígenos alogénicos de muchos tipos de células epiteliales y también se encuentran en neuronas sensitivas primarias <sup>\*(91,192,201)</sup>. Distintos estudios filogenéticos han demostrado que estos antígenos aparecen más tempranamente en los tejidos ecto o endodérmicos que en los tejidos y células hematopoyéticas mesenquimales, incluidos los eritrocitos <sup>\*(91)</sup>, por lo que distintos autores proponen el término de grupos histosanguíneos para estos antígenos carbohidratados alogénicos.

Los determinantes de grupos histosanguíneos con sus diferentes hidratos de carbono se pueden unir a lípidos (ceramidas) o a proteínas y presentarse así como glicolípidos o como glicoproteínas. Las diferencias antigénicas que se encuentran en un mismo determinante transportado por el mismo core pero que está unido a una proteína o a un lípido se desconocen.

Se cree que las dos principales causas de las diferencias antigénicas se centran por una parte en el estatus de la estructura del core y por otra en el estado de las ramificaciones. Los distintos glicoconjugados que se encuentran en humanos se han clasificado en :

	Estructura del core interno/unión	Histogrupo <sup>1</sup> sanguíneo
<i>Glicoproteínas</i>		
Uniones N-glicosil	G1cNAc $\beta$ 1→N-Asn	+
Uniones O-glicosil		
Tipo mucinas	GalNAc $\alpha$ 1→O-Ser/Thr	+
Nucleoforinas	GacNAc $\alpha$ 1→O-Ser/Thr	-
Proteoglicano	Xy1 $\beta$ 1→3Ser	-
Colágeno	Gal $\beta$ 1→5OH-Lys	-
<i>Glicoesfingolípidos</i>		
(Neo)lacto-series	G1cNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→Cer	+
Lactosilceramida	Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→Cer	+
Globo-series	Gal $\alpha$ 1→Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→Cer	+
Ganglio-series	G1cNAc $\beta$ 1→Gal $\beta$ 1→4Glc $\beta$ 1→Cer	+

+ = Carrier del epítipo definido; - = Epitopos ausentes o desconocidos.  
<sup>1</sup> Carrier de histogrupos sanguíneos ABH y antígenos relacionados en humanos.

Además de los sitios de glicosilación básicos en lípidos y proteínas que dan lugar a la variación en las estructuras oligosacáridas, hay que añadir la complejidad que se origina por la variación en los disacáridos periféricos de estos oligosacáridos. Para clarificar esta situación se propuso el término de "core interno" para designar la estructura fundamental sujeta a glicosilación y el término "core periférico" para designar al disacárido periférico que sirve como nueva estructura precursora para distintas glicosiltransferasas, las cuales finalizan el proceso de elongación de la cadena.

El fenotipo general de los epitopos ABO no se ve alterado por el core que los transporta, sin embargo la variación del core periférico induce variantes antigénicamente distintas de los epitopos de este fenotipo general. En la tabla III se resumen las principales glicosilaciones que tienen lugar en este core periférico.

**TABLA III**

	(A)	NeuAc $\alpha$	NeuAc $\alpha$	
	Gal1NAc $\alpha$	2	2	
	1	↓	↓	
	↘	3/6	6	
<b>Tipo 1</b>			1→3	
		<b>3Ga1<math>\beta</math></b>	<b>G1cNAc</b>	<b><math>\beta</math>1→ inner core</b>
<b>Tipo 2</b>			1→4	
	↗	2	4/3	
	Ga1 $\alpha$ 1	↑	↑	
	(B)	Fuc $\alpha$ 1	Fuc $\alpha$ 1	
		(Se/H)	(Le/X)	
	(A)	NeuAc $\alpha$	NeuAc $\alpha$	
	Gal1NAc $\alpha$	2	2	
	1	↓	↓	
	↘	3/6	6	
<b>Tipo 3</b>				$\alpha$ 1→
		<b>3Ga1<math>\beta</math>1→3Ga1Nac</b>		<b>inner core</b>
<b>Tipo 4</b>				$\beta$ 1→
	↗	2		
	Ga1 $\alpha$	↑		
	(B)	Fuc $\alpha$ 1		
		(Se/H)		

El desarrollo de anticuerpos monoclonales capaces de diferenciar las distintas estructuras del core periférico ha permitido el estudio de las variantes antigénicas del grupo general ABO con mayor detalle <sup>\*(202,203,204)</sup>.

Los 4 tipos de core periférico conocidos que presentan actividad ABO se han clasificado en:

- Tipo 1: Gal $\beta$ 1 → 3GlcNAc $\beta$ 1 → R
- Tipo 2: Gal $\beta$ 1 → 4GlcNAc $\beta$ 1 → R
- Tipo 3: Gal $\beta$ 1 → 3GalNAc $\alpha$ 1 → R
- Tipo 4: Gal $\beta$ 1 → 3GalNAc $\beta$ 1 → R

Estos disacáridos del core periférico se distribuyen diferencialmente en los distintos glicoconjugados y se muestran resumidos en la tabla IV:

<b>TABLA IV</b>				
	Tipo			
	1	2	3	4
<i>Glicoproteínas</i>				
Uniones N-glicosil	+	+	-	- <sup>a</sup>
Uniones O-glicosil	+	+	+	- <sup>a</sup>
<i>Glicoesfingolípidos<sup>b</sup></i>				
Lacto-series	+	+	(+) <sup>c</sup>	-
Globo-series	-	-	-	+
Ganglio-series	-	-	-	+
<p><sup>a</sup> "Las ganglio y globoseries se propusieron en principio en base a su inmunorreactividad, pero sus bases químicas no se han confirmado.</p> <p><sup>b</sup> Los determinantes ABH unidos directamente a lactosilceramidas no se incluyen.</p> <p><sup>c</sup> La cadena tipo 3 del core periférico sólo se ha encontrado en el grupo A asociado a glicolípidos.</p>				

En general, parece ser que en la especie humana la estructura tipo I es la más frecuente en el core periférico (parte inmunorreactiva), mientras que la cadena de oligosacáridos que forman el core interno está formada por una estructura tipo II de poliN-acetil-lactosamina.

Los anticuerpos utilizados en nuestro estudio (Laboratorios Signet) son específicos de cadenas tipo I y II y los clones de los que proceden han sido testados y utilizados por distintos autores en sus diferentes trabajos <sup>\*(205)</sup>.

#### **2.4.4. Características de los indicadores pronósticos histopatológicos.-**

La evolución de las pacientes con cáncer de mama es en gran medida impredecible, algunas fallecen por metástasis en el término de un año, en tanto que otras viven decenios. Existen innumerables estudios clínicos que han demostrado relaciones estadísticas entre algunos factores pronósticos y dos intervalos importantes en la progresión del cancer de mama: el momento desde el diagnóstico inicial hasta la primera recidiva, y el momento hasta la muerte por el cáncer mamario.

Los parámetros histopatológicos que deben estudiarse en cualquier paciente diagnosticada con carcinoma mamario son: el tamaño del tumor, el número de ganglios afectados, el grado nuclear y el grado histológico.

##### **a) Tamaño del tumor.-**

El conocimiento de la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico es crucial para la evaluación precisa del pronóstico. Muchos estudios han documentado la relación entre el tamaño de la masa tumoral y las expectativas de supervivencia; el tamaño del tumor constituye la base del sistema de clasificación TNM (T=tamaño de tumor, N=nº de ganglios afectados, M=metástasis). Los tumores de mayor volumen se acompañan de intervalos más breves hasta la recurrencia o la muerte <sup>\*(206)</sup>. La relación entre el tamaño del tumor y la supervivencia quinquenal parece ser linealmente independientemente del estado de los ganglios, aunque en el caso de mujeres sin metástasis en ellos, el efecto adverso del tamaño de la masa tumoral en la supervivencia parece ser menor que el observado en pacientes con metástasis en

tales estructuras. Los índices de supervivencia a los 5 años ajustados en base a la mortalidad prevista para la edad varían de 45% en tumores de más de 5 cm. de diámetro con afectación ganglionar a 96% en caso de tumores menores de 2 cm. sin afectación ganglionar <sup>\*(207)</sup>.

b) Metástasis en ganglios axilares.-

La afectación de ganglios linfáticos axilares diagnosticada sobre bases histopatológicas es un factor pronóstico importante en el cancer de mama incipiente. La región axilar es la principal área de drenaje linfático del carcinoma mamario y el ataque ganglionar constituye un marcador excelente de la posibilidad metastásica de un tumor.

El pronóstico global es muy satisfactorio en mujeres con enfermedad sin ataque ganglionar: entre 70 a 75% no tendrán recidiva después de la cirugía primaria y no necesitarán más tratamiento. En el caso de ataque ganglionar, el índice calculado de recidiva es mucho mayor, y sólo el 25 a 30% de las personas no tendrán enfermedad después del tratamiento inicial local. En el caso de tumores de igual tamaño, las mujeres sin afectación ganglionar tendrán una probabilidad de un 20% mayor de supervivencia a los 5 años que la que se observa en caso de afectación de ganglios <sup>\*(208)</sup>. La extensión de la afectación ganglionar también es un factor de enorme importancia en el pronóstico: el número mayor de ganglios afectados guarda relación con la recurrencia más temprana y la disminución de la supervivencia global. Hay un decremento neto en el pronóstico en cuanto supervivencia a largo plazo en mujeres

con cancer mamario, si tienen ataque de cuatro a cinco ganglios, en comparación con las que tienen un número menor de ganglios afectados<sup>\*(208,209)</sup>.

c) Grado nuclear.-

El cáncer más agresivo se acompaña de algunos rasgos histopatológicos particulares, y desde hace años se sabe que el alto índice mitótico, la anaplasia nuclear y la poca diferenciación celular son elementos que predicen un peor pronóstico clínico. Cuando un patólogo señala que hay incremento del grado histopatológico o disminución del nuclear, ello predice casi siempre una recurrencia más temprana o un acortamiento de la supervivencia global en las mujeres con cancer de mama <sup>\*(210)</sup>.

d) Grado histológico.-

Los acontecimientos morfológicos que tienen lugar en el grado de diferenciación del cancer de mama se ha demostrado que son de gran utilidad pronóstica, pero hasta hace poco el grado histológico del tumor no fué aceptado como un procedimiento de rutina, principalmente por los problemas que plantea en cuanto a la reproductibilidad y consistencia. El método de Bloom y Richardson, el más frecuentemente utilizado desde 1957 <sup>\*(211)</sup>, ha sido recientemente modificado con el fin de hacer más objetivos los criterios de estadiaje <sup>\*(212)</sup>. La técnica revisada utiliza la evaluación semicuantitativa de tres hechos morfológicos: el porcentaje de túbulos formados, el

grado de pleomorfismo nuclear y el conteo meticuloso de las figuras mitóticas en un campo definido.

- 1.- Formación de túbulos: cuando más del 75% del área del tumor está compuesta por túbulos definidos se le asigna una puntuación de 1. A los tumores que presentan entre el 10 y el 75% de su área con formación de túbulos se les asigna una puntuación de 2, y cuando los túbulos ocupan el 10% o menos del área tumoral se asignan 3 puntos.
- 2.- Pleomorfismo nuclear: para determinar este parámetro se utilizan criterios cualitativos y cuantitativos. Cuando el núcleo es pequeño, con poco incremento en el tamaño en relación a las células epiteliales de la mama normal, presenta bordes regulares y uniformidad en la cromatina y varía poco en tamaño se da una puntuación de 1. Cuando las células son más grandes que las normales y presentan un núcleo abierto y vesicular, con nucleolo visible y una moderada variación en el tamaño y en la forma se le asignan 2 puntos. Una marcada variación en el tamaño y en la forma, especialmente cuando el núcleo es muy grande y anómalo, recibe una puntuación de 3; en este grupo el núcleo es vesicular con nucleolos prominentes y a menudo múltiples.
- 3.- Contaje mitótico: La actividad mitótica se estima mejor en la periferia del tumor donde el crecimiento activo es más probable. Es necesario realizar el recuento en un mínimo de 10 campos y aplicar unos criterios estrictos contando únicamente los núcleos en los que aparezcan acontecimientos morfológicos claros de metafase, anafase o telofase. Los núcleos hipercromáticos o apoptóticos no se contabilizan

y hay que tener un cuidado especial para no confundir los linfocitos con células tumorales en división. La puntuación se asigna de la siguiente manera: hasta 9 mitosis por 10 campos 1 punto; de 10 a 19 mitosis 2 puntos, y más de 20 mitosis 3 puntos.

Para determinar el grado total del tumor se suman las puntuaciones de cada categoría dando un resultado total que varía de 3 a 9. El grado del tumor se distribuye entonces en:

3-5 puntos: grado I - bien diferenciado

6-7 puntos: grado II - moderadamente diferenciado

8-9 puntos: grado III - pobremente diferenciado

Existe una correlación altamente significativa entre el grado histológico y el pronóstico, tanto con el intervalo libre de enfermedad y fundamentalmente con un peor pronóstico en pacientes con tumores pobremente diferenciados comparados con los tumores bien diferenciados.

## **2.5 VALORACION DE LOS RESULTADOS**

Los resultados fueron evaluados en cada caso y en secciones realizadas en material fijado en Líquido de Carnoy mediante la tabulación porcentual de las células positivas, especificando la intensidad de la reacción y su localización celular.

El número de células positivas varió desde 0 (ausencia de células positivas) a 100% (todas las células del corte positivas), mientras que la intensidad de la reacción fué fijada en una escala arbitraria variable entre 0-negativa, 1-debilmente positiva, 2-moderadamente positiva y 3-intensamente positiva.

### **2.5.1. Expresión de Receptores hormonales.-**

Para valorar los resultados obtenidos tras la aplicación de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores de hormonas esteroideas se siguieron criterios de agrupamiento en función del número de células tumorales que presentaban tinción nuclear. Tanto para el receptor de estrógenos como para el de progesterona se determinaron tres grupos de probable interés pronóstico: casos con el receptor negativo en las células tumorales; casos que presentaban un número menor o igual al 20% de las células tumorales positivas para la tinción y casos con más del 20% de células tumorales positivas para los receptores. El sistema de tabulación de los resultados es el mismo que el descrito por Barnes R. y su equipo <sup>(213)</sup>.

### **2.5.2.-Expresión de los marcadores de proliferación.-**

Los resultados obtenidos tras la tabulación de los marcadores de proliferación nuclear se analizaron construyendo grupos, como en el caso anterior, en función del porcentaje de células marcadas en el núcleo para cada uno de los dos anticuerpos utilizados. En el caso de MIB-1 los casos se dividieron en 3 grupos; un primer grupo lo formaron los casos en los que no encontramos ninguna célula tumoral marcada, el segundo grupo lo compusieron los casos que presentaban un número menor o igual al 20% de células

tumorales positivas para la tinción y el último grupo lo formaban aquellos casos que exhibían más del 20% de células tumorales marcadas <sup>\*(214)</sup>.

En el caso de la PCNA se establecieron 4 grupos: negativos para la tinción; casos que expresaban el antígeno en menos del 5% de células tumorales; casos que presentaban entre el 6-20% de células tumorales teñidas y casos que expresaban más del 20% de las células tumorales positivas para la tinción <sup>\*(215)</sup>.

### **2.5.3.-Expresión de grupos sanguíneos (ABO):**

Para valorar la expresión de los isoantígenos sanguíneos en las células tumorales se hicieron tres grupos siguiendo los criterios de Tatsuhiko N. y colaboradores <sup>\*(205)</sup>: el primer grupo estaba formado por los casos que no presentaban tinción en ninguna célula tumoral; el segundo grupo lo formaban los casos que presentaban un número menor o igual al 50% de células tumorales teñidas y el tercer grupo estaba constituido por los casos que expresaban más del 50% de células tumorales positivas para la tinción.

### **2.5.4.-Expresión de isoantígenos sanguíneos Lewis.-**

Para valorar la expresión de los isoantígenos sanguíneos Lewis se hicieron grupos en base a la expresión de los antígenos tanto en los controles internos (vasos sanguíneos, hematíes o tejido mamario normal) como en las células tumorales. De esta forma obtuvimos tres grupos principales en lo que se refiere a los controles internos: un primer grupo que presentaba control interno positivo para la tinción; un segundo grupo que

presentaba el control interno negativo para la tinción y un tercer grupo en el que no se encontró ningún tipo de control interno en la preparación histológica utilizada en la tinción inmunohistoquímica correspondiente. La ausencia de controles internos se debía, en la mayoría de los casos, al pequeño tamaño de la muestra y a la cantidad de secciones histológicas que fue preciso realizar en cada una de ellas para la realización de las técnicas. El sistema de tabulación utilizado para las células tumorales fue el mismo que el descrito para los grupos ABO.

Con estos dos criterios de agrupamiento se construyeron tablas de contingencia con dos vías de entrada, una para el control y otra para el tumor, obteniendo así 9 subgrupos de probable interés pronóstico.

## **2.6 ANALISIS ESTADISTICO**

La circunstancia básica que obliga a acudir al Método Estadístico al pretender obtener deducciones de un conjunto de datos biológicos estriba en la variabilidad intrínseca de los mismos.

Los parámetros analizados en un nuestro trabajo son de dos tipos:

⇒ de centralización: informan alrededor de que valor se agrupan los datos

⇒ de dispersión: dan una idea de si el agrupamiento es muy disperso o muy concentrado.

De esta manera se puede sustituir toda la información obtenida en el experimento por sólo tres valores: El número de componentes, o tamaño de la muestra; el valor medio, como medida de centralización, y la desviación típica, como medida de dispersión.

Para comprobar si los resultados de nuestro trabajo se ajustan a una ley teórica utilizaremos la  $X^2$ ; esta distribución nos permite establecer la conformidad de una distribución experimental y una distribución teórica; la dependencia o independencia entre caracteres cualitativos, y el contraste de homogeneidad de un conjunto de muestras.

---

## **III. Resultados**

### **III.-RESULTADOS**

En este apartado estudiaremos estadísticamente los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas de tinción y su valoración al microscopio óptico, mediante un sistema semicuantitativo.

El estudio de los datos se realizó por grupos independientes en cada uno de los cuales se llevó a cabo un análisis descriptivo de los resultados y un test de asociación de la  $X^2$  para establecer la relación entre la expresión de los isoantígenos sanguíneos con cada uno de los marcadores tumorales e histoanatomopatológicos utilizados en nuestro trabajo.

Dado el número de anticuerpos utilizados y el volumen de la muestra, analizaremos separadamente la expresión de los distintos marcadores para posteriormente establecer la relación, si la hubiere, entre cada isoantígeno sanguíneo y el resto de los parámetros utilizados en nuestro estudio.

#### ***3.1. Marcadores histoanatomopatológicos.***

Los criterios histoanatomopatológicos para la clasificación de los casos se expusieron con detalle en el apartado de material y métodos.

### 3.1.1. Tamaño del tumor.

De los 88 casos estudiados 61 presentaron un tumor menor o igual a 2 cms.; en 17 el tumor alcanzó un valor entre 2 y 5 cms.; y en 3 casos el tumor exhibía una medida superior a los 5 cms. En 7 casos no se pudo determinar el diámetro del tumor debido a que la muestra procedía de biopsia y no de resección quirúrgica y fue imposible determinar si la muestra comprendía todo el tumor o éste se extendía más allá del material remitido.

### 3.1.2. Afectación de ganglios linfáticos regionales.

45 de los 88 casos analizados en este estudio no presentaron ningún ganglio afectado; 18 mostraron menos de 5 ganglios colonizados; y 10 presentaron afectados mas de 5 ganglios del total de ganglios aislados. En 15 casos la axila no fue reseccionada por lo que fue imposible el estudio de los ganglios. En 8 de estos 15 casos el tumor era menor o igual a 2 cm.; en 1 caso el tumor media entre 2 y 5 cm. y en 6 casos el material procedía de biopsia.

### 3.1.3. Grado histológico.

De los 88 casos analizados 29 se encuadraron según los criterios anatomopatológicos descritos en el apartado de Material y Metodos como grado I, 38 correspondieron a grado II y 21 a grado III.

#### 3.1.4. Grado nuclear.

22 de los 88 casos que componen nuestra muestra se diagnosticaron como tumores de grado nuclear 1, 6 de grado nuclear 1-2; 34 de grado nuclear 2, 11 de grado nuclear 2-3; y 15 de grado nuclear 3.

### 3.2. **Expresión de Receptores hormonales.**

#### 3.2.1. Receptor de estrógenos.

De los 88 casos útiles para la expresión de receptores hormonales 27 (31%) fueron negativos para la expresión del receptor de estrógenos, 15 (17%) expresaron el receptor en menos del 20% de las células tumorales y 46 (52%) lo hicieron en más del 20% de estas células. En la totalidad de los 61 casos positivos el patrón de expresión fue nuclear. 20 de los casos mostraron una intensidad de tinción débil, 2 una intensidad débil-moderada, 13 intensidad moderada, 13 intensidad moderada-fuerte y 13 exhibieron una intensidad fuerte. En las distintas zonas estudiadas se pudo observar que, en el mismo campo, los núcleos positivos mostraban diferentes intensidades de tinción. (Figura 1).

#### 3.2.2. Receptor de progesterona.

Por lo que se refiere al receptor de progesterona, 22 casos (25%) resultaron negativos para la expresión del receptor, 31 (35%) expresaron el marcador en menos del 20% de

las células neoplásicas, y 35 (40%) lo hicieron en más del 20% de estas células. De los 66 casos positivos 10 mostraron una intensidad débil de tinción, 8 intensidad débil-moderada, 8 intensidad moderada, 21 intensidad moderada-fuerte y 19 intensidad fuerte. En todos los casos el patrón de expresión fue claramente nuclear, aunque en algunos se pudo observar una ligera tinción citoplásmica atribuible a la difusión del cromógeno o a un ligero marcaje del receptor en su tránsito hacia el núcleo. (Figura 2).

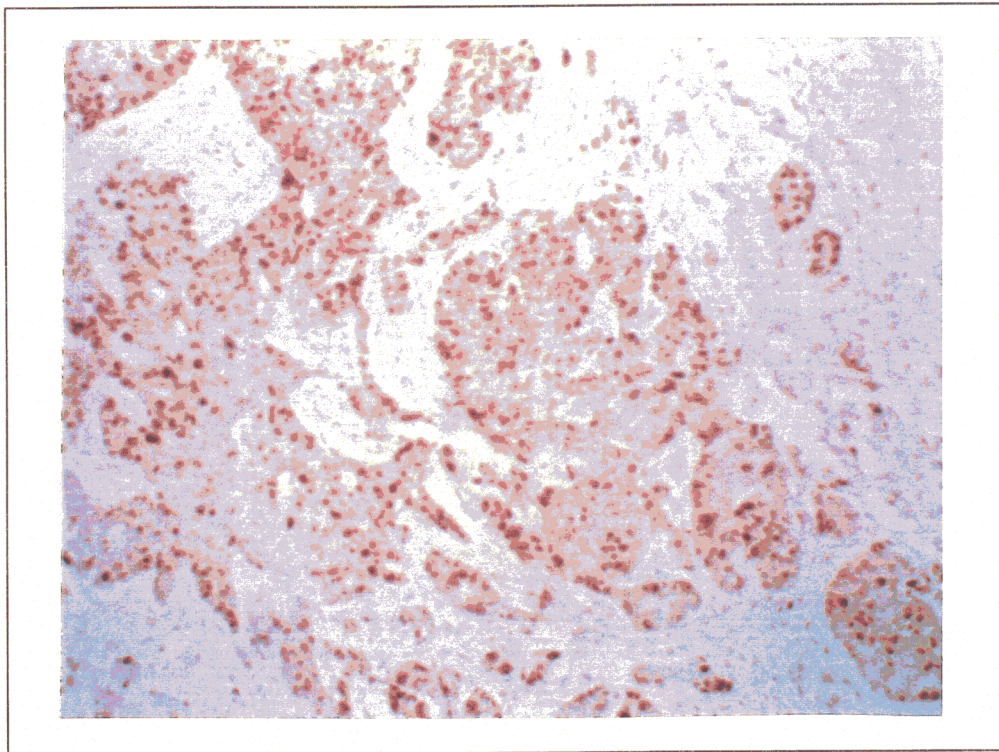


Figura 1: Patrón de distribución nuclear heterogéneo del RE en el epitelio glandular normal y en el tejido tumoral (ABC)

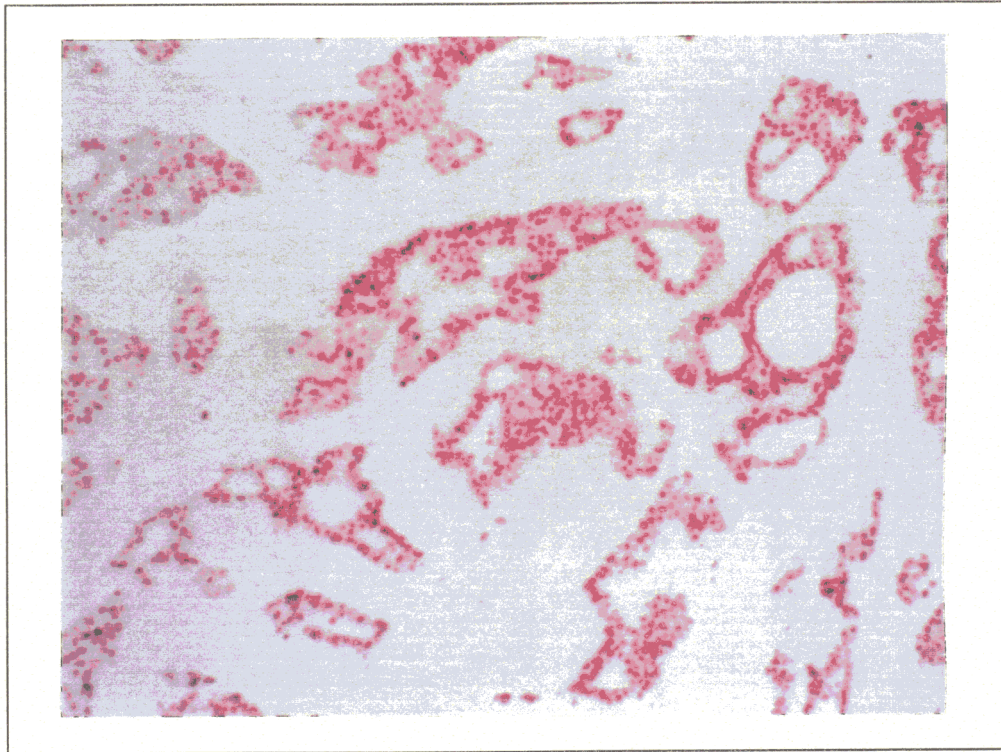


Figura 2: Expresión nuclear del Rpg (B-SA). Obsérvese la microheterogeneidad de la tinción.

### **3.3. Expresión de los marcadores de proliferación.**

#### **3.3.1. Marcador de proliferación Ki-67 (MIB-1).**

De los 88 casos analizados para el marcador de proliferación Ki-67 (MIB-1) 5 (6%) resultaron negativos, 58 (66%) lo expresaron en menos del 20% de las células tumorales y 25 (28%) lo hicieron en mas del 20% de tales células. Por lo que se refiere a la intensidad de tinción, 30 casos expresaron el marcador con una intensidad débil, 2 con intensidad débil-moderada, 19 con intensidad moderada, 13 moderada-fuerte, y 19 con intensidad fuerte. El patrón de expresión fue en todos los casos nuclear, observándose distintas zonas de expresión dentro del núcleo. No se observó difusión citoplásmica en ninguno de los casos. La media de células teñidas fue 18%. (Figura 3).

### 3.3.2. Marcador de proliferación PCNA (PC10).

En cuanto al marcador PCNA 3 casos (3%) fueron negativos para el marcador, 20 (23%) lo expresaron en menos del 5% de las células tumorales, 29 (33%) lo expresaron en 6-20% de estas células y 36 (41%) expresaban el marcador en mas del 20% de las células tumorales.

15 casos mostraron intensidad débil, 6 débil-moderada, 18 moderada, 24 moderada fuerte, y 22 una intensidad fuerte. La tinción se localizó en el núcleo, observándose en algunos casos una ligera tinción citoplásmica. En las áreas estudiadas se pudo constatar la presencia de distintas intensidades de tinción dentro de un mismo campo de observación. (Figura 4).

La media de células con marcaje para este anticuerpo fue del 22%.

### 3.4. **Expresión de grupos sanguíneos (ABO).**

De los 88 casos estudiados en nuestro trabajo tan solo 82 fueron útiles para la expresión de los grupos histosanguíneos.

De estos 82 casos 41 (50%) resultaron ser grupo A; 7 (8,5%) fueron grupo B; 27 (33%) fueron grupo O; y 7 (8,5%) fueron grupo AB.

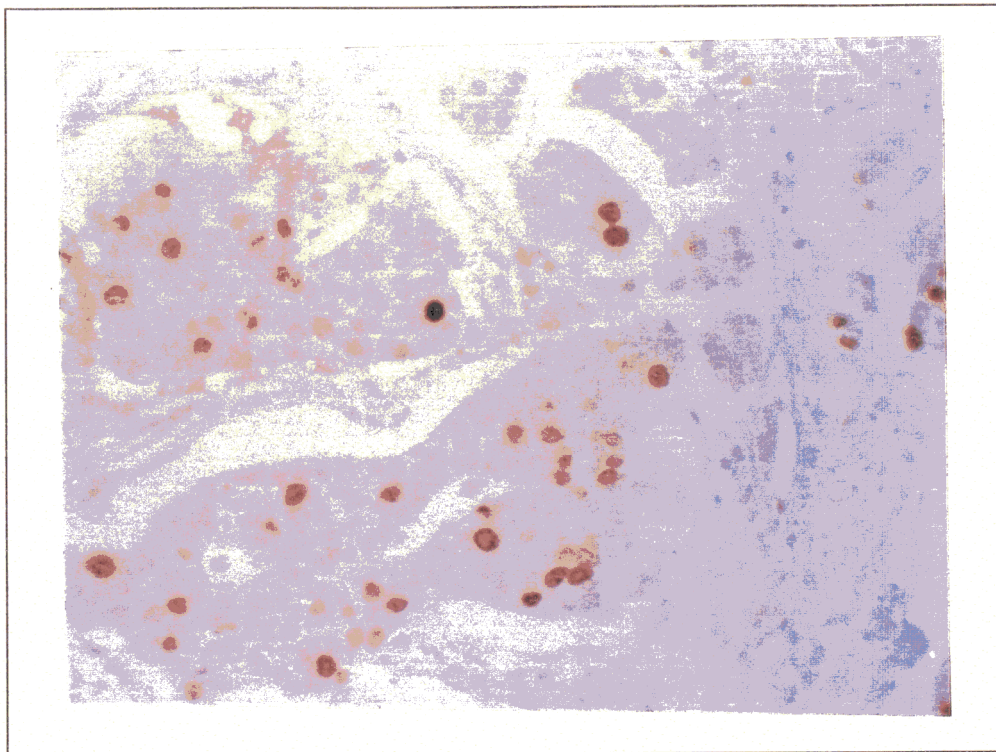


Figura 3: Expresión nuclear diferencial del antígeno Ki67 (MIB-1) según las fases del ciclo celular (ABC).

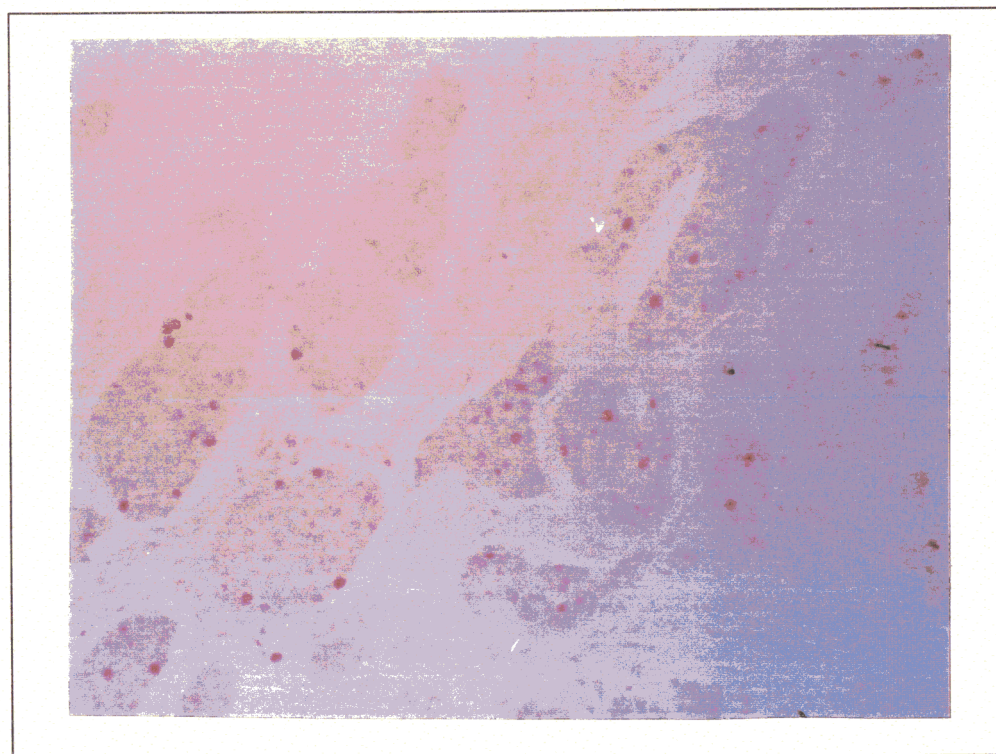
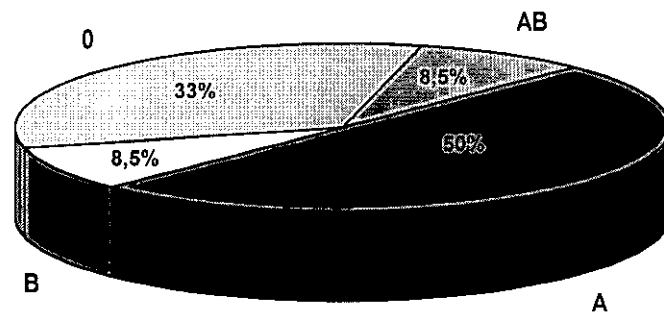


Figura 4: Expresión nuclear del antígeno PCNA (B-SA). Observese la ligera tinción citoplásmica.

Los datos expuestos anteriormente se resumen en la figura 1.



#### 3.4.1. Grupo A.

De los 41 casos que fueron grupo A, 28 perdieron la expresión del antígeno de grupo en las células tumorales, lo que representa el 68% del total de casos grupo A; 9 (22%) expresaron el isoantígeno en menos del 50% de células tumorales; y 4 (10%) expresaron este marcador en mas del 50% de las células tumorales. (Figura 5).

Después de analizar globalmente la expresión del isoantígeno de grupo sanguíneo A, se estudió la expresión del resto de los marcadores en cada uno de los subgrupos y se estableció la relación entre la expresión de los marcadores de probable interés pronóstico y la expresión del isoantígeno en estudio. Los datos obtenidos se resumen en la tabla V.

**TABLA V**

<b>Expresión Grupo A/resto marcadores (en número absoluto de casos)</b>				
<b>GRUPO A</b>		<b>T -</b>	<b>T ≤ 50 %</b>	<b>T &gt; 50 %</b>
<b>RE</b>	-	7	4	0
	≤ 20 %	6	2	2
	> 20 %	15	3	2
<b>RPg</b>	-	10	3	2
	≤ 20 %	9	4	0
	> 20 %	2	0	2
<b>Ki67</b>	-	2	0	0
	≤ 20 %	20	7	2
	> 20 %	6	2	2
<b>PCNA</b>	-	0	1	0
	≤ 5 %	8	5	0
	6-20	7	1	2
	> 20 %	13	2	2
<b>GH</b>	I	6	4	2
	II	13	2	1
	III	9	3	1
<b>GN</b>	1	6	4	0
	1-2	1	0	2
	2	10	2	1
	2-3	7	2	0
	3	4	1	1
<b>∅ Diámetro Tumor</b>	≤ 2 %	20	4	3
	2-5	5	4	0
	> 5 %	0	1	1
	ND	3	0	0
<b>Ganglios</b>	-	15	6	2
	≤ 5	6	0	3
	> 5	2	1	0
	NA	5	2	1

T: tumor; RE: receptor estrógenos; Rpg: receptor progesterona; GH: grado histológico; GN: grado nuclear; ∅: tamaño tumor; (-) n°. de casos en que ninguna célula expresa el marcador correspondiente; (≤) n°. de casos en los que el n°. de células que expresan el marcador es menor o igual al número que aparece en la leyenda; (>) n°. de casos en los que las células expresan el marcador en más del número que aparece en leyenda; ND: no determinado; NA: no aislados.

Como se puede observar en la tabla, el número de casos (en valor absoluto) que expresan el isoantígeno A en el tumor aumenta a medida que aumenta la expresión de los receptores de estrógeno y progesterona, y además, hay que resaltar que los dos únicos casos con una expresión del receptor de progesterona superior al 20% en las células tumorales, expresaban también el isoantígeno de grupo A en más del 50% de estas células. Por lo que se refiere a los marcadores de proliferación cabe destacar que se observa una disminución del número de casos positivos para la expresión del antígeno de grupo sanguíneo A a medida que aumenta el número de células positivas para los marcadores Ki-67 (MIB-1) y PCNA. En cuanto a los marcadores histoanatomopatológicos, se observa una pérdida de expresión del isoantígeno de grupo A según aumenta el grado histológico, el grado nuclear, el tamaño del tumor y el número de ganglios afectados. Además también hay que resaltar, que aunque el número de casos positivos para la expresión del isoantígeno no varíe radicalmente, si se observa que disminuye el número de células positivas para el marcador de grupo A.

#### 3.4.2. Grupo B.

De los 7 casos que fueron grupo B, 4 (57%) perdieron la expresión del antígeno de grupo en las células tumorales, y 3 (43%) expresaron el isoantígeno en menos del 50% de células tumorales. No obtuvimos ningún grupo que expresara este marcador en más del 50% de las células tumorales.

Como en el caso anterior, después de analizar globalmente la expresión del isoantígeno de grupo sanguíneo B, estudiamos la expresión del resto de los marcadores en cada uno de los subgrupos y establecimos la relación entre la expresión de los marcadores de probable interés pronóstico y la expresión del isoantígeno en estudio. Los datos obtenidos se resumen en la tabla VI.

TABLA VI

Expresión Grupo B/resto marcadores (en número absoluto de casos)			
GRUPO B		T -	T ≤ 50 %
RE	-	2	0
	≤ 20 %	1	1
	> 20 %	1	2
RPg	-	1	1
	≤ 20 %	3	2
	> 20 %	0	0
Ki67	-	2	2
	≤ 20 %	1	0
	> 20 %	1	1
PCNA	-	0	0
	≤ 5 %	2	1
	6-20	0	2
	> 20 %	2	1
GH	I	1	1
	II	2	1
	III	1	1
GN	1	1	0
	1:2	0	1
	2	1	1
	2:3	1	1
	3	1	0
∅ Diametro Tumor	≤ 2	2	3
	2-5	1	0
	> 5	0	0
	ND	1	0
Ganglios	-	1	2
	≤ 5	1	0
	> 5	0	1
	NA	2	0

T: tumor; RE: receptor estrógenos; Rpg: receptor progesterona; GH: grado histológico; GN: grado nuclear; ∅: tamaño tumor; (-) n°. de casos en que ninguna célula expresa el marcador correspondiente; (≤) n°. de casos en los que el n°. de células que expresan el marcador es menor o igual al número que aparece en la leyenda; (>) n°. de casos en los que las células expresan el marcador en más del número que aparece en leyenda; ND: no determinado; NA: no aislados.

Como en el caso del isoantígeno A, se observa a partir de los datos obtenidos, que el número de casos que expresan el isoantígeno B aumenta a medida que aumenta el número de células positivas para el receptor de estrógenos, si bien no sucede lo mismo en el caso del receptor de progesterona donde tan solo 2 de los tres casos que expresan el receptor también expresan el isoantígeno B. En lo que se refiere a los marcadores de proliferación, los resultados obtenidos revelan que la expresión del isoantígeno B no varía significativamente con la distinta expresión de los marcadores Ki-67 y PCNA.. Tampoco se observan diferencias significativas de la expresión del isoantígeno B al variar el grado histológico y nuclear, pero sí se constata una pérdida del isoantígeno a medida que aumenta el tamaño del tumor y el número de ganglios afectados.

#### 3.4.3. Grupo AB.

De los 7 casos que fueron grupo AB, 3 perdieron la expresión de los dos antígenos de grupo en las células tumorales, lo que representa el 43% del total de casos grupo AB; 2 (28,5%) perdieron la expresión de grupo A y mantuvieron la expresión de grupo B y 2 (28,5%) mantuvieron la expresión de A y B. No obtuvimos ningún caso que perdiera la expresión de grupo A y mantuviera la de B.

Tras analizar globalmente la expresión del isoantígeno de grupo sanguíneo AB, procedimos de igual manera que en los casos anteriores. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VII.

**TABLA VII**

Expresión Grupo AB/resto marcadores (en número absoluto de casos)				
GRUPO AB		A-B-	A-B+	A+B+
RE	-	0	0	1
	≤ 20 %	0	1	0
	> 20 %	3	1	1
RPg	-	1	0	0
	≤ 20 %	0	0	2
	> 20 %	2	2	0
Ki67	-	0	0	1
	≤ 20	2	2	1
	> 20	1	0	0
PCNA	-	0	0	0
	≤ 5	0	0	1
	6-20	1	1	1
	> 20	2	1	0
GH	I	0	1	2
	II	3	1	0
	III	0	0	0
GN	1	0	2	2
	1-2	1	0	0
	2	2	0	0
	2-3	0	0	0
	3	0	0	0
∅	≤ 2	3	1	0
	2-5	0	1	2
	> 5	0	0	0
	ND	0	0	0
Ganglios	-	2	1	2
	≤ 5	1	1	0
	> 5	0	0	0
	NA	0	0	0

T: tumor; RE: receptor estrógenos; Rpg: receptor progesterona; GH: grado histológico; GN: grado nuclear; ∅: tamaño tumor; (-) n°. de casos en que ninguna célula expresa el marcador correspondiente; (≤) n°. de casos en los que el n°. de células que expresan el marcador es menor o igual al número que aparece en la leyenda; (>) n°. de casos en los que las células expresan el marcador en más del número que aparece en leyenda; ND: no determinado; NA: no aislados.

De los resultados obtenidos se desprende que los 3 casos que perdieron la expresión para los dos antígenos de grupo presentaban expresión para el receptor de estrógenos en más del 20% de las células tumorales; de los dos casos que perdieron la expresión para el isoantígeno de grupo A, uno expresaba el receptor de estrógenos en menos del 20% de las células tumorales y el otro en más del 20%. De los dos casos que conservaron la expresión para ambos isoantígenos, 1 resultó ser negativo para la expresión del receptor de estrógenos y otro lo expresó en más del 20% de las células tumorales. Por lo que se refiere al receptor de progesterona, 1 de los 3 casos negativos para los dos isoantígenos también lo fue para la expresión del receptor, y los otros dos casos lo expresaron en más del 20% de las células tumorales. Los dos casos que perdieron la expresión del isoantígeno A expresaron el receptor de progesterona en más del 20% de las células tumorales, y los dos casos que mantuvieron la expresión de los antígenos de grupo expresaron el receptor de progesterona en menos del 20% de las células tumorales. En cuanto a los marcadores de proliferación se observó que se expresaban en un mayor número de células cuando los casos eran negativos para uno o los dos isoantígenos de grupo y que el único caso que mantuvo la expresión de los dos isoantígenos sanguíneos fue negativo para Ki-67 y expresó PCNA en menos del 5% de las células tumorales. Por lo que respecta a los marcadores histoanatomopatológicos hay que resaltar que el mejor comportamiento lo presentaban los dos casos que mantuvieron la expresión de los 2 isoantígenos de grupo sanguíneo.

3.4.4. Grupo O.

De los 82 casos estudiados para la expresión de grupo sanguíneo 27 fueron grupo O. En ninguna de las pacientes pertenecientes a este grupo se observó cambio fenotípico de grupo. La relación entre la expresión de grupo O y el resto de los parámetros analizados en este trabajo se resumen en la tabla VIII.

**TABLA VIII**

Expresión Grupo O/resto marcadores (en número absoluto de casos)		
GRUPO O		T.
RE	-	10
	≤ 20 %	2
	> 20 %	15
Rpg	-	5
	≤ 20 %	9
	> 20 %	13
Ki67	-	1
	≤ 20 %	15
	> 20 %	11
PCNA	-	1
	≤ 5 %	4
	6-20	10
	> 20 %	12
GH	I	9
	II	11
	III	7
GN	1	6
	1-2	0
	2	14
	2-3	1
	3	6
∅ Diametro Tumor	≤ 2	20
	2-5	3
	> 5	1
	ND	3
Ganglios	-	11
	≤ 5	4
	> 5	6
	NA	6

T: tumor; RE: receptor estrógenos; Rpg: receptor progesterona; GH: grado histológico; GN: grado nuclear; ∅: tamaño tumor; (-) n°. de casos en que ninguna célula expresa el marcador correspondiente; (≤) n°. de casos en los que el n°. de células que expresan el marcador es menor o igual al número que aparece en la leyenda; (>) n°. de casos en los que las células expresan el marcador en más del número que aparece en leyenda; ND: no determinado; NA: no aislados.

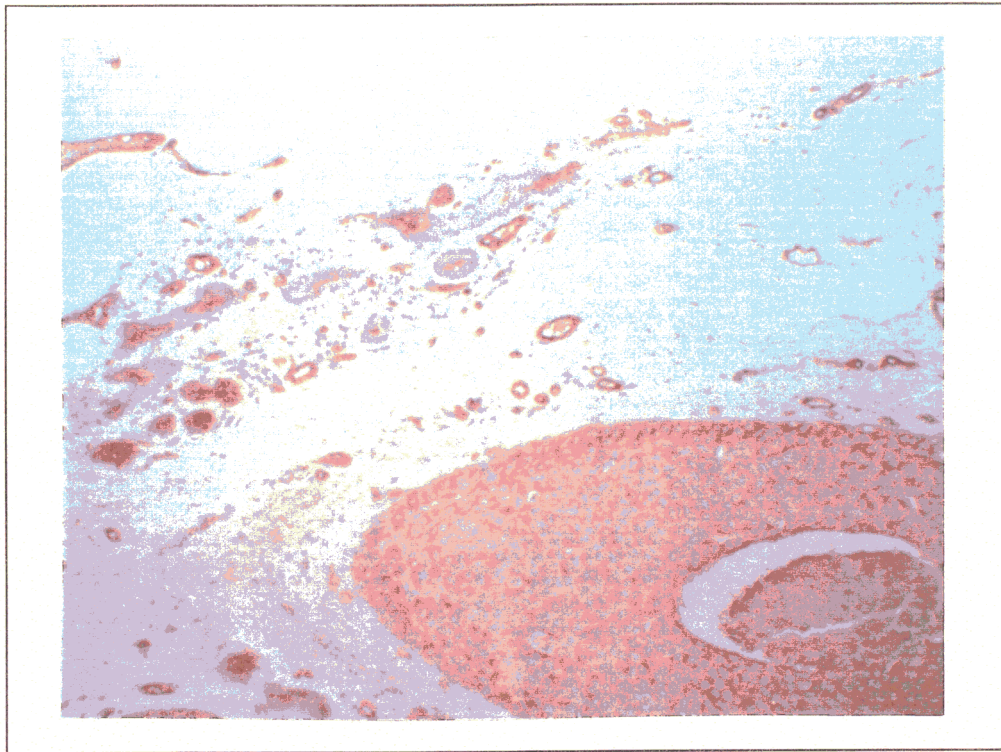


Figura 5: Expresión del grupo sanguíneo A (BG-2) en el tejido mamario normal, células endoteliales y células tumorales (ABC).

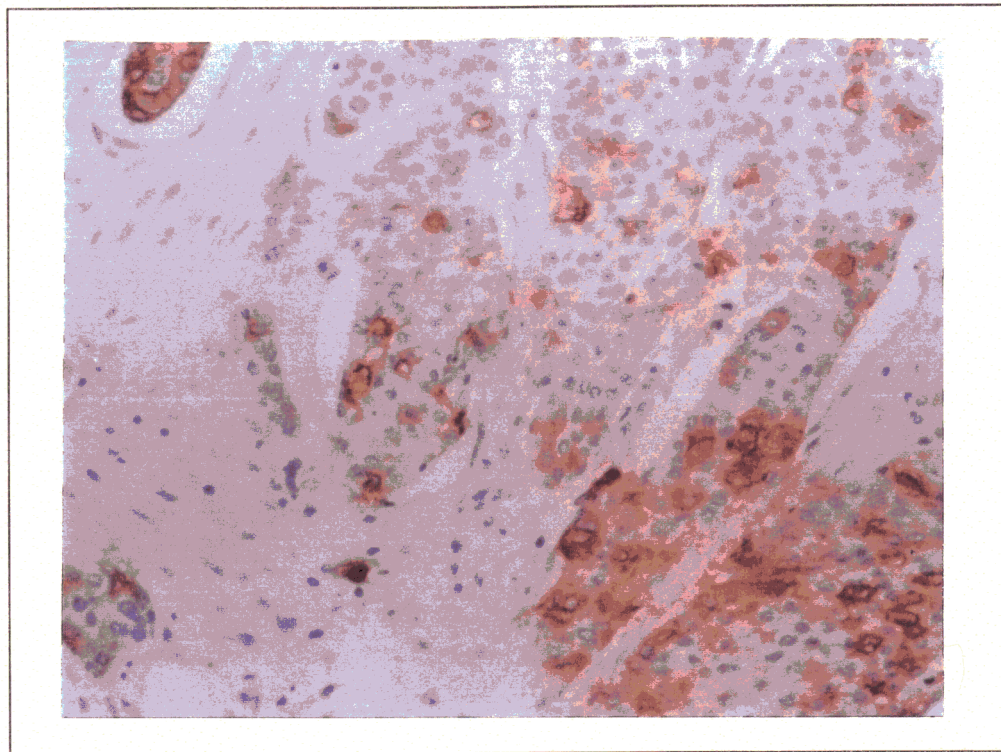


Figura 6: Expresión membranosa y citoplásmica microheterogénea del grupo sanguíneo B (BG-3) (ABC).

### **3.5. Expresión de isoantígenos sanguíneos Lewis.**

#### **3.5.1. Lewis a.**

---

Para el estudio de la expresión del isoantígeno Lewis a fueron útiles 85 de los 88 casos analizados en nuestro trabajo, lo que representa el 97% de la muestra.

De estos 85 casos 50 (59%) fueron positivos para el control interno; 9 (10,5%) no mostraron tinción en el control interno y en 26 casos (30,5%) en el corte utilizado para la tinción no aparecía control interno alguno.

De los 50 casos con el control interno positivo 17 (34%) no expresaban el isoantígeno en células tumorales; 31 (62%) lo expresaban en menos del 50% de células tumorales y tan solo 2 (4%) expresaban más del 50% de células tumorales positivas. (Figura 7).

De los 9 casos que presentaban el control interno negativo para el isoantígeno en estudio, 8 (89%) no mostraron expresión en células tumorales; tan solo 1 caso (11%) expresó menos del 50% de células tumorales postivas para este marcador, y no obtuvimos ningún caso que expresara el isoantígeno en mas del 50% de células tumorales.

De los 26 casos que no presentaban control interno en el corte utilizado, 15 (58%) fueron negativos para la tinción en las células tumorales; 8 (31%) presentaron menos del 50% de células tumorales positivas para el isoantígeno y 3 (11%) lo expresaron en mas del 50% de células tumorales.

Los datos anteriormente expuestos se resumen en la tabla IX.

<b>TABLA IX Expresión de Lewis a</b>				
<b>Le<sup>a</sup></b>				
	T-	T $\leq$ 50%	T $>$ 50%	TOTAL
C+	17	31	2	50
C-	8	1	0	9
NoC	15	8	3	26
TOTAL	40	40	5	85

*C: control para la expresión de Le<sup>a</sup> ; NOC: no se encontró control en la muestra analizada; T: tumor; (-) ninguna célula expresó Le<sup>a</sup> en tumor; ( $\leq$  o  $>$ ): menos o más del número expresaron Le<sup>a</sup> en tumor.*

Después de analizar globalmente la expresión del isoantígeno Le<sup>a</sup>, se estudió la expresión del resto de los marcadores en cada uno de los subgrupos y se trató de establecer una relación entre la expresión de los marcadores de probable interés pronóstico y la expresión del isoantígeno en estudio. Los datos obtenidos se sumarian en la tabla X.

		TABLA X - Expresión Le <sup>a</sup> /resto marcadores (en número absoluto de casos)								
		C+T-	C+T≤50	C+T>50	C-T-	C-T≤50	C-T>50	NoCT-	NoCT≤50	NoCT>50
RE	-	1	6	0	5	0	0	10	1	2
	≤ 20	2	7	0	2	0	0	1	2	0
	> 20	14	18	2	1	1	0	4	5	1
RPg	-	2	6	1	4	0	0	5	3	0
	≤ 20	6	11	0	4	0	0	4	1	3
	> 20	9	14	1	0	1	0	6	4	0
KI67	-	2	2	0	0	0	0	0	0	1
	≤ 20	10	23	2	6	1	0	8	5	1
	> 20	5	6	0	2	0	0	7	3	1
PCNA	≤ 5	3	8	1	3	0	0	3	1	0
	6-20	6	12	1	0	0	0	5	4	1
	> 20	8	11	0	5	1	0	6	3	2
GH	I	7	12	0	2	0	0	3	4	0
	II	8	12	2	4	1	0	6	3	1
	III	2	7	0	2	0	0	6	1	2
GN	1	4	11	0	1	0	0	4	2	0
	1-2	0	3	0	1	0	0	0	1	0
	2	8	7	2	4	1	0	5	4	2
	2-3	1	5	0	1	0	0	3	1	1
	3	4	5	0	1	0	0	3	0	0
Ganglios	-	9	18	0	4	1	0	6	5	1
	≤ 5	4	6	1	2	0	0	2	1	1
	> 5	1	1	1	1	0	0	5	0	1
	NA	3	6	0	1	0	0	2	2	0
∅	≤ 2	12	21	2	6	1	0	11	5	1
	2-5	3	8	0	1	0	0	1	2	2
	> 5	1	0	0	1	0	0	1	0	0
	ND	1	2	0	0	0	0	2	1	0

Los datos obtenidos revelaron que en los casos en los que el control interno era positivo para la expresión del isoantígeno Le<sup>a</sup>, la expresión de este isoantígeno en las células tumorales era superior en aquellos casos que también presentaban el receptor de estrógenos y progesterona positivos . No se encontró ningún caso con el control interno negativo que expresara el isoantígeno en estudio en las células tumorales y que además expresara positividad para el receptor de estrógenos, y tan sólo un caso fue positivo para el receptor de progesterona y además expresó el isoantígeno Le<sup>a</sup>. En los casos en los que no fue posible valorar el control interno se observó un aumento de la expresión del isoantígeno de grupo Le<sup>a</sup> en las células tumorales que también expresaban positividad para el receptor de estrógenos y progesterona.

En cuanto a la expresión de los marcadores de proliferación, se pudo comprobar que en los casos con el control interno positivo, la máxima expresión del isoantígeno correspondía a los casos que expresaban Ki-67 en un número menor o igual al 20% de las células tumorales y que también expresaban PCNA en menos del 20% de estas células. Tan solo un caso con el control interno negativo expresó el isoantígeno Le<sup>a</sup> en menos del 50% de las células tumorales, y además este caso exhibía una positividad para Ki-67 de menos del 20% de las células tumorales y lo mismo sucedía en el caso del PCNA. Los casos en los que no obtuvimos control interno mostraban menor expresión del isoantígeno en estudio a medida que aumentaba la expresión para Ki-67; en cuanto al PCNA , el número de casos negativos para la expresión del isoantígeno en el tumor pasó de 3 cuando las células que expresaban PCNA presentaban como máximo el 5% de células marcadas a 6 cuando el número de células positivas para el marcador de proliferación era superior al 20%.

Por lo que se refiere a los marcadores histoanatomopatológicos se observa que tan sólo 2 de los casos con el control interno positivo expresan el isoantígeno Le<sup>a</sup> en más del 50% de las células tumorales y que estos casos corresponden a un grado histológico II y a un grado nuclear 2, también se pudo comprobar una disminución en la expresión del isoantígeno en las células tumorales a medida que aumentaba el tamaño del tumor y el número de ganglios afectados. En cuanto a los casos con el control interno negativo, tan sólo 1 caso expresó el antígeno Le<sup>a</sup> y en menos del 50% de las células tumorales y este caso se asociaba a un grado histológico II y un grado nuclear 2, a no afectación ganglionar y a un tamaño tumoral menor a 2 cmts. En los casos en los que no se identificó control interno, la expresión del isoantígeno Le<sup>a</sup> fue variable, aunque se pudo observar una disminución de la expresión del isoantígeno según aumentaba el grado histológico, el grado nuclear, el tamaño del tumor y el número de ganglios afectados.

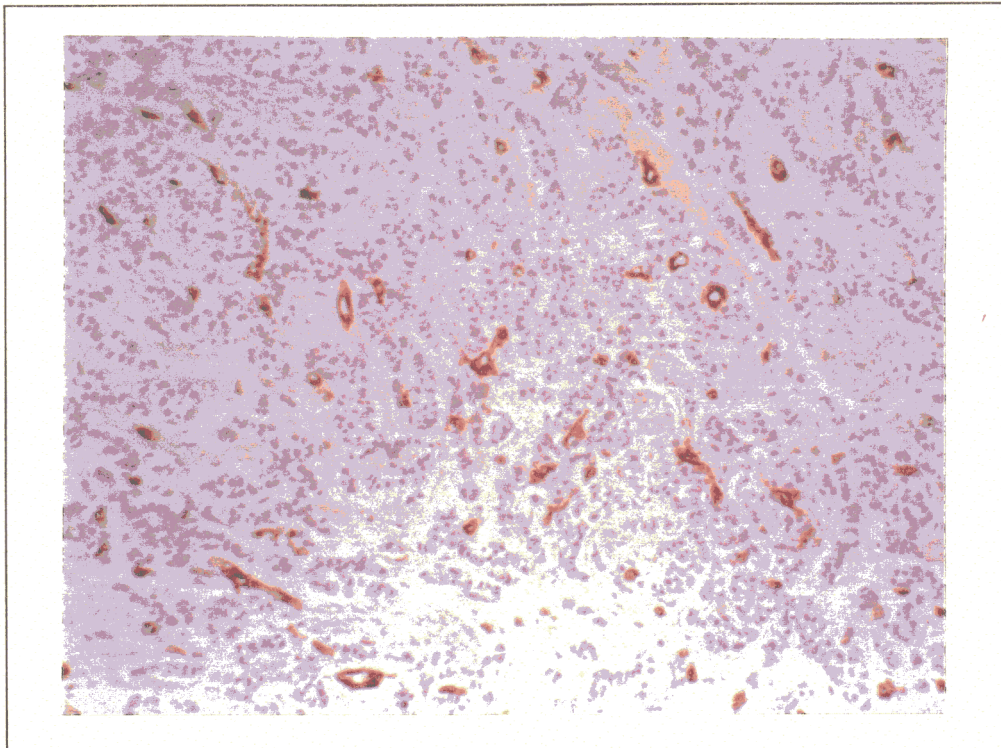


Figura 7: Pérdida de expresión del isoantígeno Le<sup>a</sup> en el tejido tumoral, manteniéndose la expresión en células endoteliales (ABC).

### 3.5.2. LEWIS b.

Para el estudio de la expresión del isoantígeno Le<sup>b</sup> fueron útiles 87 de los 88 casos analizados en nuestro trabajo, lo que representa el 99% de la muestra.

De estos 87 casos 51 (59%) fueron positivos para el control interno; 17 (19%) no mostraron tinción en el control interno y en 19 casos (22%) en el corte utilizado para la tinción no aparecía control interno alguno.

De los 51 casos con el control interno positivo 14 (27%) no expresaban el isoantígeno en células tumorales; 34 (67%) lo expresaban en menos del 50% de células tumorales y tan solo 3 (6%) expresaban más del 50% de células tumorales positivas. (Figura 8).

De los 17 casos que presentaban el control interno negativo para el isoantígeno en estudio, 8 (47%) no mostraron expresión en células tumorales; 7 casos (41%) expresaron menos del 50% de células tumorales positivas para este marcador, y 2 (12%) expresaron el isoantígeno en mas del 50% de células tumorales.

De los 19 casos que no presentaban control interno en el corte utilizado, 7 (37%) fueron negativos para la tinción en las células tumorales; 11 (58%) presentaron menos del 50% de células tumorales positivas para el isoantígeno y 1 (5%) lo expresó en mas del 50% de células tumorales.

Los datos anteriormente expuestos se resumen en la tabla XI.

<b>TABLA XI (Expresión Lewis b)</b>				
<b>Le<sup>b</sup></b>				
	T-	T≤50	T>50	TOTAL
C+	14	34	3	51
C-	8	7	2	17
NoC	7	11	1	19
TOTAL	29	52	6	87

*C: control para la expresión de Le<sup>a</sup> ; NOC: no se encontró control en la muestra analizada; T: tumor; (-) ninguna célula expresó Le<sup>a</sup> en tumor; (≤ o >): menos o más del número expresaron Le<sup>a</sup> en tumor.*

Como en el caso anterior la relación de la expresión del isoantígeno Le b, y el resto de los marcadores en cada uno de los subgrupos se resume en la tabla XII.

TABLA XII Expresión Le <sup>b</sup> /resto marcadores (en número absoluto de casos)										
		C+T-	C+T≤50	C+T>50	C-T-	C-T≤50	C-T>50	NoCT-	NoCT≤50	NoCT>50
RE	-	5	4	1	3	2	1	4	6	0
	≤ 20	1	10	0	1	1	0	1	1	1
	> 20	8	20	2	4	4	1	2	4	0
RPg	-	2	8	1	3	1	0	4	3	0
	≤ 20	8	9	0	3	3	2	2	1	1
	> 20	4	17	2	2	3	0	1	7	0
Ki67	-	0	2	0	0	2	0	0	0	0
	≤ 20	12	22	3	6	4	2	2	8	0
	> 20	2	10	0	2	11	0	5	3	1
PCNA	≤ 5	3	10	1	3	0	0	2	1	1
	6-20	5	11	1	3	2	1	0	3	0
	> 20	6	11	1	2	2	1	5	7	0
GH	I	5	11	2	3	2	1	1	2	0
	II	6	13	0	4	4	0	3	6	1
	III	3	10	1	1	1	1	3	3	0
GN	1	5	8	0	1	2	0	1	3	0
	1-2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
	2	4	11	1	4	3	2	3	6	1
	2-3	2	6	1	0	1	0	2	2	0
	3	1	7	0	2	1	0	1	2	0
Ganglios	-	5	15	2	6	3	0	2	8	0
	≤ 5	3	9	1	0	1	2	2	0	0
	> 5	2	2	0	1	1	0	1	2	1
	NA	4	8	0	0	2	0	2	1	0
∅	≤ 2	10	24	3	7	6	1	5	6	0
	2-5	3	6	0	1	1	1	1	3	0
	> 5	0	1	0	0	0	0	0	1	1
	ND	1	3	0	0	0	0	1	1	0

Los datos obtenidos demuestran que en los casos con el control interno positivo para el isoantígeno sanguíneo, el número de casos que lo expresan en el tumor aumenta a medida que aumenta la expresión para el receptor de estrógenos y progesterona. Lo mismo sucede para los casos que presentan el control interno negativo y para los casos en los que no se obtuvo control interno. También se pudo observar que entre los casos con el control interno positivo para Le<sup>b</sup>, los que expresaban el isoantígeno en mayor grado correspondían con los que mostraban una expresión para Ki-67 menor o igual al 20% de las células tumorales; la mayor expresión para Le<sup>b</sup> también se observó en los casos que mostraban una positividad para PCNA no superior al 20% de las células tumorales. La expresión tumoral del isoantígeno en los casos que el control interno era negativo, fue más variable, observándose tanto en las células que presentaban el menor marcaje para los antígenos de proliferación como en las que presentaban un marcaje superior al 20% de las células tumorales. El comportamiento de los casos que no presentaban control interno fue equiparable al de los casos con el control interno positivo. Por otra parte, y en los casos con el control interno positivo, se observó expresión del isoantígeno Le<sup>b</sup> en todo el espectro del grado nuclear e histológico, pero se pudo constatar una disminución de los casos positivos para el isoantígeno a medida que aumentaba el número de ganglios afectados y el tamaño del tumor; en los casos con el control interno negativo y en los casos que no presentaban control interno, la expresión del isoantígeno en relación con los marcadores histoanatomopatológicos fue sumamente variable.

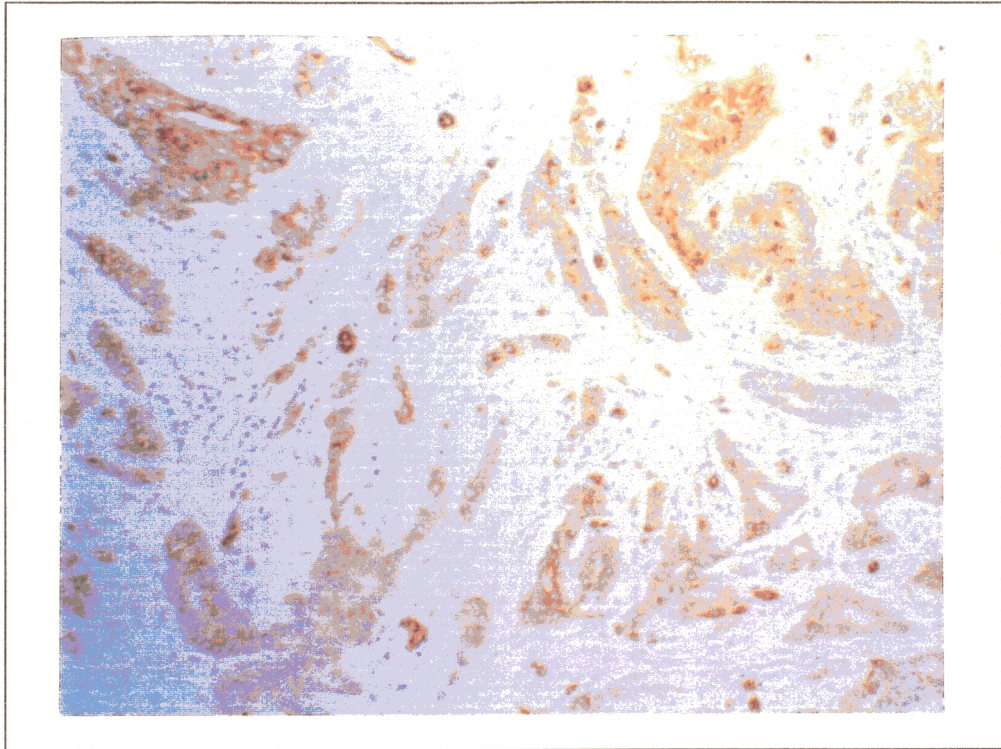


Figura 8: Expresión microheterogénea del isoantígeno Le<sup>b</sup> en el tejido tumoral y en el epitelio glandular normal y células endoteliales (ABC).

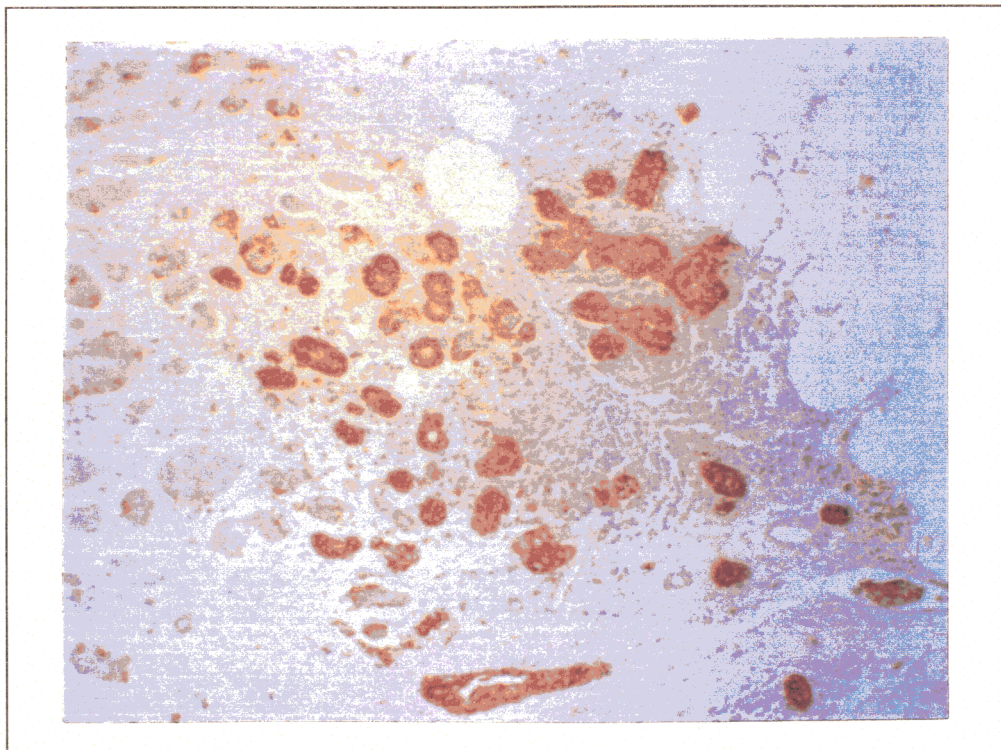


Figura 9: Expresión microheterogénea del isoantígeno Le<sup>x</sup> en menos del 50% de las células tumorales (ABC).

### 3.5.3. LEWIS x.

Para el estudio de la expresión del isoantígeno Lewis x fueron útiles 87 de los 88 casos analizados en nuestro trabajo, lo que representa el 99% de la muestra.

De estos 87 casos 50 (57%) fueron positivos para el control interno; 4 (5%) no mostraron tinción en el control interno y en 33 casos (38%) en el corte utilizado para la tinción no aparecía control interno alguno.

De los 50 casos con el control interno positivo 18 (36%) no expresaban el isoantígeno en células tumorales; 25 (50%) lo expresaban en menos del 50% de células tumorales y 7 (14%) expresaban más del 50% de células tumorales positivas. (Figura 9).

De los 4 casos que presentaban el control interno negativo para el isoantígeno en estudio, 1 (25%) no mostró expresión en células tumorales; 3 casos (75%) expresaron menos del 50% de células tumorales positivas para este marcador, y no encontramos ningún caso que expresara el isoantígeno en más del 50% de células tumorales.

De los 33 casos que no presentaban control interno en el corte utilizado, 13 (39%) fueron negativos para la tinción en las células tumorales; 16 (49%) presentaron menos del 50% de células tumorales positivas para el isoantígeno y 4 (12%) lo expresaron en más del 50% de células tumorales.

Los datos anteriormente expuestos se resumen en la tabla XIII.

TABLA XIII (Expresión Lewis x)				
Le <sup>x</sup>				
	T-	T≤50	T>50	TOTAL
C+	18	25	7	50
C-	1	3	0	4
NoC	13	16	4	33
TOTAL	32	44	11	87

C: control para la expresión de Le<sup>a</sup> ; NOC: no se encontró control en la muestra analizada; T: tumor; (-) ninguna célula expresó Le<sup>a</sup> en tumor; (≤ o >): menos o más del número expresaron Le<sup>a</sup> en tumor.

La relación de este isoantígeno con el resto de los marcadores utilizados en nuestro estudio se resumen en la tabla XIV.

TABLA XIV - Expresión Le <sup>x</sup> / resto marcadores (en número absoluto de casos)										
		C+T-	C+T≤50	C+T>50	C-T-	C-T≤50	C-T>50	NoCT-	NoCT≤50	NoCT>50
RE	-	5	5	1	1	0	0	6	7	2
	≤ 20	5	5	1	0	0	0	2	0	1
	> 20	8	15	5	0	3	0	5	9	1
RPg	-	4	4	3	1	0	0	6	3	1
	≤ 20	6	10	3	0	1	0	4	4	2
	> 20	8	11	1	0	2	0	3	9	1
Ki67	-	1	0	2	0	0	0	1	0	1
	≤ 20	10	19	4	1	2	0	9	11	1
	> 20	7	6	1	0	1	0	3	5	2
PCNA	≤ 5	4	6	2	0	1	0	2	2	2
	6-20	7	7	2	1	0	0	5	6	0
	> 20	7	12	3	0	2	0	6	6	1
GH	I	6	9	2	0	0	0	4	6	1
	II	8	11	3	0	2	0	5	6	2
	III	4	5	2	1	1	0	4	4	1
GN	1	5	6	3	0	0	0	3	4	1
	1-2	0	3	0	0	1	0	2	0	0
	2	6	11	2	0	1	0	4	7	2
	2-3	3	2	1	0	0	0	3	2	1
	3	3	3	1	1	1	0	1	3	0
Ganglios	-	10	9	7	0	2	0	8	7	1
	≤ 5	4	8	0	1	0	0	2	2	1
	> 5	0	4	0	0	1	0	1	3	1
	NA	4	4	0	0	0	0	2	4	0
∅	≤ 2	14	16	5	1	3	0	9	13	1
	2-5	4	4	2	0	0	0	3	2	2
	> 5	0	2	0	0	0	0	0	1	0
	NA	0	3	0	0	0	0	1	0	1

Como se puede observar, en los casos positivos para el control interno, el número de casos positivos para la expresión en el tumor aumenta a medida que aumenta la expresión para el receptor de estrógenos y progesterona. Este mismo hecho se observó en los casos con el control interno negativo y en los casos en los que no se obtuvo control interno. El comportamiento de la expresión de ese marcador en relación al resto de los parámetros analizados en este estudio es exactamente igual al descrito para la expresión del isoantígeno Le<sup>b</sup>.

#### 3.5.4. LEWIS y.

Para el estudio de la expresión del isoantígeno Lewis y fueron útiles 85 de los 88 casos analizados en nuestro trabajo, lo que representa el 97% de la muestra.

De estos 87 casos 55 (65%) fueron positivos para el control interno; 2 (2%) no mostraron tinción en el control interno y en 28 casos (33%) en el corte utilizado para la tinción no aparecía control interno alguno.

De los 55 casos con el control interno positivo no encontramos ninguno que no expresara el isoantígeno en el tumor, 22 (40%) lo expresaban en menos del 50% de células tumorales y 33 (60%) lo expresaban más del 50% de células tumorales positivas. (Figura 10).

De los 2 casos que presentaban el control interno negativo para el isoantígeno en estudio, los dos expresaban el isoantígeno en menos del 50% de células tumorales.

De los 28 casos que no presentaban control interno en el corte utilizado, 3 (11%) fueron negativos para la tinción en las células tumorales; 5 (18%) presentaron menos del 50% de células tumorales positivas para el isoantígeno y 20 (71%) lo expresaron en más del 50% de células tumorales.

Los datos anteriormente expuestos se resumen en la tabla XV.

<b>Le<sup>y</sup></b>				
	T-	T≤50	T>50	TOTAL
C+	0	22	33	55
C-	0	2	0	2
NoC	3	5	20	28
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>29</b>	<b>53</b>	<b>85</b>

*C: control para la expresión de Le<sup>a</sup> ; NOC: no se encontró control en la muestra analizada; T: tumor; (-) ninguna célula expresó Le<sup>a</sup> en tumor; (≤ o >): menos o más del número expresaron Le<sup>a</sup> en tumor.*

Como en los casos anteriores, después de analizar globalmente la expresión del isoantígeno Le<sup>y</sup>, estudiamos la expresión del resto de los marcadores en cada uno de los subgrupos. Los datos obtenidos se recogen en la tabla XVI.

		TABLA XVI - Expresión Lev / resto marcadores ( número de casos)								
		C+T-	C+T≤50	C+T>50	C-T-	C-T≤50	C-T>50	NoCT-	NoCT≤50	NoCT>50
RE	-	0	7	7	0	0	0	2	2	8
	≤ 20	0	2	10	0	0	0	0	0	3
	> 20	0	13	16	0	2	0	1	3	9
RPg	-	0	6	7	0	0	0	0	2	6
	≤ 20	0	4	15	0	2	0	1	1	5
	> 20	0	8	12	0	0	0	1	2	4
Ki67	-	0	1	0	0	1	0	0	0	2
	≤ 20	0	13	21	0	1	0	2	3	14
	> 20	0	8	12	0	0	0	1	2	4
PCNA	≤ 5	0	2	8	0	2	0	1	3	3
	6-20	0	7	10	0	0	0	1	1	9
	> 20	0	12	15	0	0	0	1	1	7
GH	I	0	8	9	0	2	0	2	2	6
	II	0	6	15	0	0	0	1	2	9
	III	0	8	9	0	0	0	0	1	4
GN	1	0	6	6	0	1	0	2	1	5
	1-2	0	2	2	0	0	0	0	0	1
	2	0	6	11	0	1	0	1	3	10
	2-3	0	2	8	0	0	0	0	1	1
	3	0	6	6	0	0	0	0	0	2
Ganglios	-	0	12	17	0	2	0	2	3	8
	≤ 5	0	6	8	0	0	0	1	0	2
	> 5	0	0	3	0	0	0	0	0	6
	NA	0	4	5	0	0	0	0	2	3
0	≤ 2	0	17	23	0	2	0	1	3	13
	2-5	0	3	6	0	0	0	2	1	4
	> 5	0	0	2	0	0	0	0	0	1
	ND	0	2	2	0	0	0	0	1	1

De los datos resumidos en la tabla se desprende que ningún caso con el control interno positivo, perdió la expresión del isoantígeno Le<sup>y</sup> en su totalidad y además, los 16 casos que expresaban el isoantígeno en más del 50% de las células tumorales también expresaban el receptor de estrógenos en más del 20% de las células, mientras que la expresión máxima del isoantígeno se correspondía con una expresión para el receptor de progesterona menor o igual al 20%. Tampoco se encontró ningún caso que con el control interno negativo expresara el isoantígeno en el tumor en más del 50% de las células tumorales; y los 2 únicos casos que expresaron el isoantígeno en el tumor también expresaban positividad para el receptor de estrógenos en más del 20% de las células y para el de progesterona en un número menor o igual al 20%. En los casos en los que no se encontró control interno, un único caso expresó Ki-67 en más del 20% de las células y 1 expresó PCNA en menos del 5% de las células tumorales; la máxima expresión del isoantígeno en los casos sin control interno se correspondía con una expresión de Ki-67 menor o igual al 20% y con una expresión para PCNA entre el 6-20% de las células tumorales. Por lo que concierne a los marcadores histoanatomopatológicos, la máxima expresión del isoantígeno Le<sup>y</sup> en las células tumorales, y en los casos con el control interno positivo, se obtuvo en aquellos casos que presentaban un grado histológico II y un grado nuclear 2, el tamaño del tumor no superaba los 2 cms. y no mostraban afectación ganglionar; los 2 casos con el control interno negativo presentaron grado histológico I, grado nuclear 1 y 2, respectivamente, no afectación ganglionar y una masa tumoral menor a los 2 cms. La relación existente entre los parámetros morfológicos y los casos en los que no se pudo determinar el control interno, fue igual a la descrita para los casos con el control interno positivo.

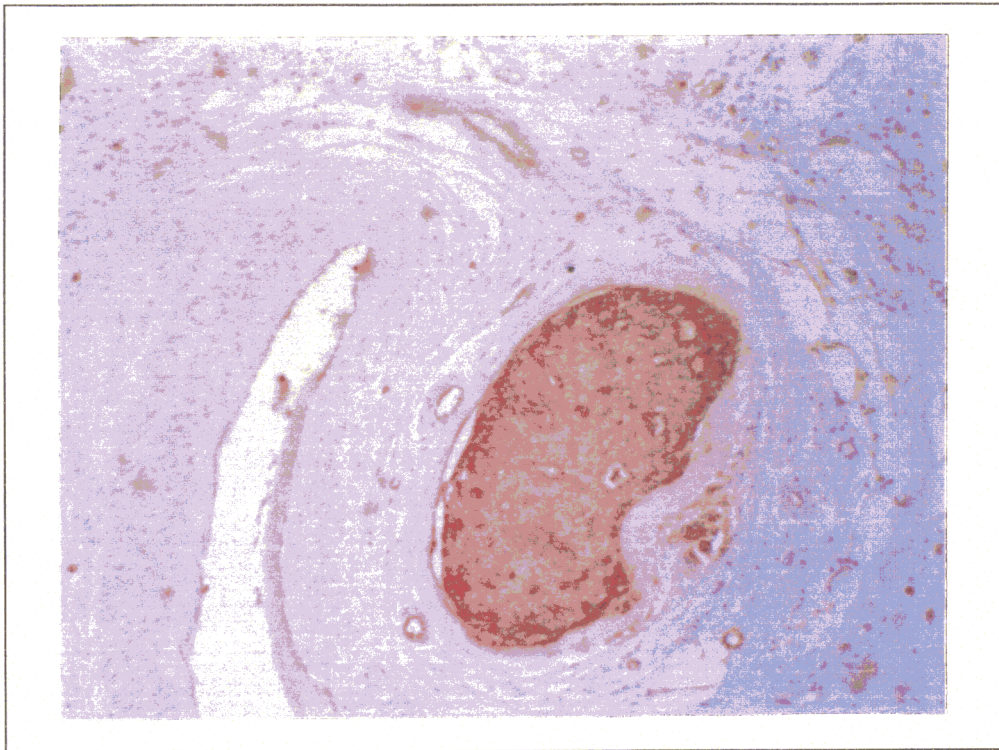


Figura 10: Expresión del isoantígeno Le<sup>y</sup> en más del 50% de las células tumorales y en las células endoteliales (ABC).

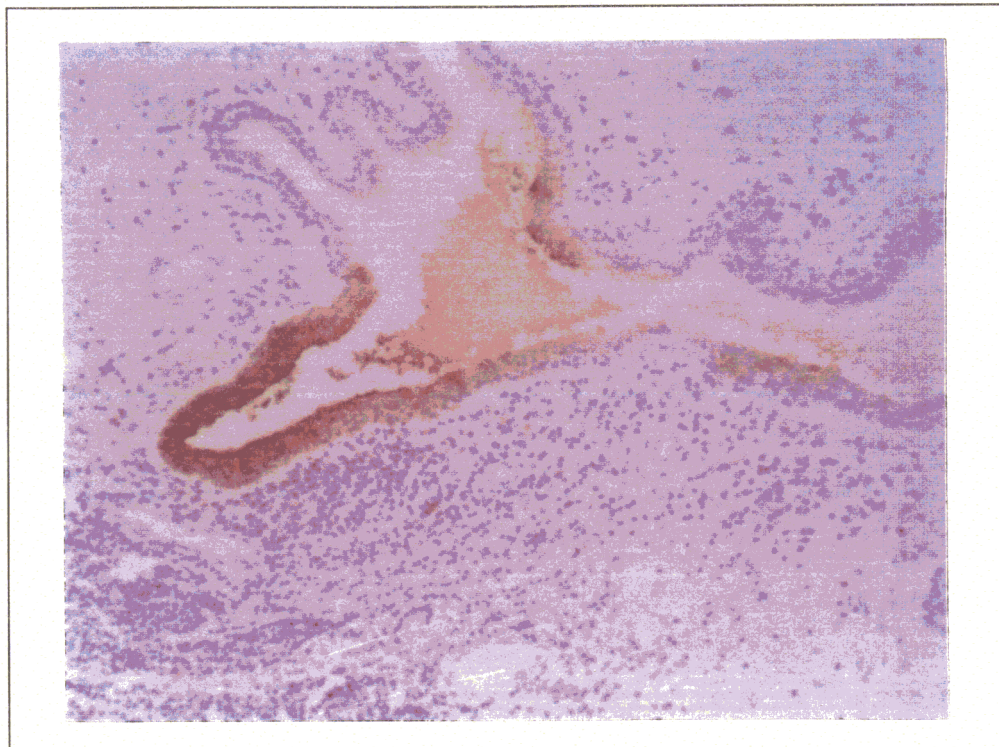


Figura 11: Detalle de la microheterogeneidad de expresión del isoantígeno Le<sup>b</sup> en un conducto mamario normal (ABC)

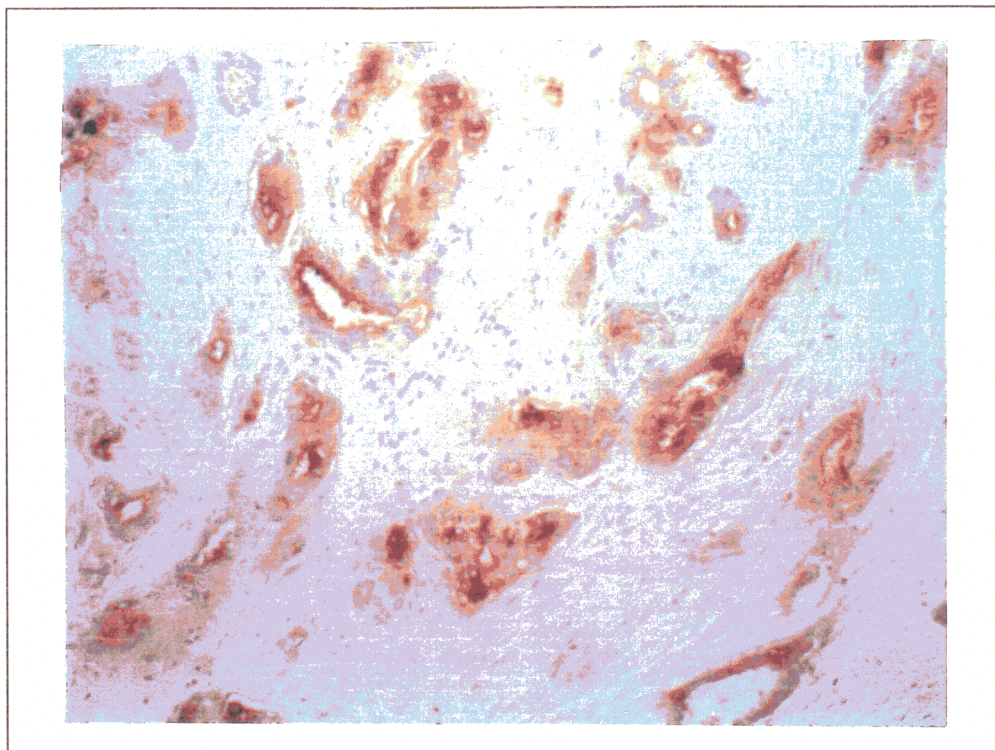


Figura 12: Detalle de la expresión microheterogénea del isoantígeno Le<sup>x</sup> en tejido tumoral (ABC).

El patrón de expresión para ABO y Lewis fue en todos los casos citoplásmico o membranoso, observándose una clara microheterogeneidad de la expresión en todos los casos analizados. (Figuras 11 y 12).

Los valores obtenidos tras aplicar el test de asociación  $X^2$  ( $p < 0.001$ ) bajo la hipótesis nula de que la pérdida de expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis se asocia con menor expresión de los receptores de hormonas esteroides; con mayor expresión de los marcadores de proliferación y con mayor tamaño tumoral, grado histológico, nuclear y afectación ganglionar, nos permitió aceptar la hipótesis de trabajo.

---

## **IV. Discusión**

## **IV.-DISCUSIÓN**

En este apartado analizaremos, por una parte, el procedimiento técnico utilizado y su validez para la demostración de marcadores tumorales y de grupo sanguíneo; en segundo lugar estudiaremos la utilidad de los marcadores empleados para este trabajo y su probable valor pronóstico y por último, discutiremos los resultados obtenidos en nuestro estudio tomando como base los datos existentes en la literatura.

### ***4.1. Análisis de los procedimientos técnicos utilizados.***

La Inmunohistoquímica ha sido uno de los avances más significativos en la patología diagnóstica durante la última década. Los estudios inmunohistoquímicos han sido extremadamente útiles en la evaluación de los tumores pobremente diferenciados y en el esclarecimiento de otras patologías, en base a sus diferencias antigénicas. Junto a las aplicaciones diagnósticas, la Inmunohistoquímica ha contribuido al conocimiento de la naturaleza celular de muchos tumores y ha ayudado a clarificar la taxonomía tumoral y el concepto de las interrelaciones en las neoplasias. El rápido desarrollo de la Inmunohistoquímica en el diagnóstico procede del descubrimiento de nuevas moléculas del citoesqueleto y la superficie celular y de la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos

contra ellos, y del desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas de detección sumamente sensibles y que se pueden visualizar al microscopio <sup>(216)</sup>.

La inmunodetección de antígenos es un proceso en dos pasos que requiere en primer lugar la unión de un anticuerpo al antígeno que queremos demostrar, y en segundo, la detección y visualización del anticuerpo unido, por medio de un sistema de enzimas cromogénicas.

El reactivo común y principal de todas las técnicas inmunohistoquímicas es el anticuerpo. Los antisueros que contienen anticuerpos específicos para un número cada vez mayor de antígenos tisulares con utilidad clínica, han aumentado enormemente la cantidad y calidad del repertorio inmunohistológico.

Para explotar plenamente la utilidad de los métodos inmunohistoquímicos de tinción es necesario un conocimiento previo de los anticuerpos y sus potenciales y también de sus limitaciones.

Los anticuerpos utilizados en nuestro estudio son anticuerpos monoclonales; la elección de este tipo de anticuerpos frente a los anticuerpos policlonales se realizó en base a su alta homogeneidad, ausencia de anticuerpos inespecíficos, fácil caracterización y ausencia de variabilidad en los distintos lotes. Sin embargo, también hubo que tener en cuenta algunos inconvenientes que presentan estos anticuerpos: 1.- los métodos de screening de los clones utilizados y de control de calidad deben ser idénticos a los métodos para los cuales el anticuerpo fue diseñado; 2.- muy frecuentemente los anticuerpos monoclonales se caracterizan utilizando tejidos congelados, y posteriormente se utilizan en muestras fijadas; 3.- el epítipo diana debe sobrevivir a la fijación. En algunos casos, un antígeno puede soportar los efectos

de la fijación, por ejemplo en formaldehído, pero el epitopo particular con el que reacciona el anticuerpo monoclonal no. De forma similar, la reactividad de un epitopo tras unas condiciones óptimas de fijación no asegura necesariamente su supervivencia bajo condiciones diferentes.

4.- el epitopo elegido debe ser único en el antígeno. Una de las mayores ventajas que ofrecen los anticuerpos monoclonales se perderá si el anticuerpo se utiliza contra un epitopo compartido por dos o más antígenos diferentes.

Las condiciones en las que se realiza la fijación repercuten de manera esencial en el resultado de las técnicas Inmunohistoquímicas, por ello debe tenerse en cuenta que:

- ⇒ Los fijadores que actúan por precipitación de proteínas (como los fijadores ácidos de Bouin o Carnoy), el alcohol etílico y los compuestos a base de metales pesados (como el B5 o el Líquido de Zenker), suelen producir mejores resultados que los fijadores que actúan por reticulación (como el formaldehído) o los que contienen oxidantes, como la solución de Helly (Zenker-formol).
- ⇒ El tiempo de fijación debe ser el necesario para preservar la imagen histológica: un exceso de fijación reduce la inmunorreactividad de los tejidos.
- ⇒ El efecto de cada fijador sobre un antígeno puede ser distinto según la localización histológica y anatómica de dicho antígeno.
- ⇒ En muestras de gran volumen, la fijación por inmersión en la solución fijadora proporciona resultados variables en cuanto a la positividad inmunohistoquímica, ya que las zonas mejor fijadas se teñirán más que las situadas más profundamente.

⇒ Existen determinantes antigénicos de superficie o receptores nucleares cuya determinación en tejidos fijados no proporciona buenos resultados.

⇒ La fijación debe ser inmediata para evitar la autólisis.

De lo anteriormente se expuesto se deduce que el proceso de fijación es clave para la obtención de buenos resultados en la realización de técnicas inmunohistoquímicas, y que el fijador ideal no existe, por lo que a la hora de elegir la mezcla fijadora para llevar a cabo cualquier tipo de estudio hay que considerar detenidamente la estructura que queremos demostrar, su localización histológica, celular y anatómica y sus características bioquímicas.

El formaldehído disminuye la inmunorreactividad de los antígenos tisulares porque produce reacciones cruzadas entre los grupos amino terminales de las proteínas que se encuentran fundamentalmente en los residuos de lisina.

Los fijadores ácidos que actúan por precipitación de proteínas y contienen ácido pícrico o ácido acético preservan mejor que los alcoholes y la formalina la antigenicidad de Inmunoglobulinas y polipéptidos así como los Hidratos de Carbono.

La acción fijadora del Líquido de Carnoy es extremadamente rápida, deshidratando el tejido al mismo tiempo.

En nuestro trabajo elegimos este fijador, después de contrastar la efectividad de las técnicas utilizando otros fijadores, ya que con él obtuvimos una buena preservación de la estructura tisular y celular y una inmunorreactividad de los determinantes antigénicos muy satisfactoria.

El restablecimiento de la inmunorreactividad tisular, en los casos en los que fue necesario, se realizó por métodos enzimáticos y por la utilización de altas temperaturas en microondas.

La digestión enzimática es útil principalmente para los métodos realizados sobre tejidos fijados en formaldehído, sin embargo, no mejora demasiado la inmunotinción de tejidos fijados en mezclas fijadoras como el Líquido de Carnoy; además, la digestión enzimática si es excesiva puede llegar a producir la destrucción del tejido; por digestión del antígeno puede debilitarse la tinción o crear falsos negativos y además se pueden desenmascarar fragmentos proteicos comunes a diversos antígenos y por tanto incrementar la tinción inespecífica.

El mecanismo de acción de la recuperación de antígenos por medio de microondas no se conoce con exactitud. Shi y su equipo defienden la hipótesis de que el efecto de las reacciones cruzadas producidas por la fijación en formaldehído se alteran al calentar las muestras en microondas <sup>\*(217)</sup>.

Este método de recuperación de antígenos está plenamente establecido en todos los Laboratorios de Anatomía Patológica y son muchos los distribuidores que recomiendan este método de desenmascaramiento antigénico en la hoja de datos de sus anticuerpos.

Por otra parte son muchas las publicaciones que hacen referencia a este sistema, fundamentalmente aquellas que se refieren a los marcadores de proliferación celular y a la demostración de hormonas esteroides en secciones fijadas y embebidas en parafina <sup>\*(218,219,220,221)</sup>.

La elección del método de tinción es el segundo punto a tener en cuenta antes de realizar cualquier técnica Inmunohistoquímica.

Tradicionalmente los métodos de detección inmunohistoquímicos se han clasificado en dos grandes grupos: métodos directos y métodos indirectos.

a) Métodos directos:

Son los procedimientos más sencillos, de un solo paso; es decir tan solo aplicamos el anticuerpo específico frente al antígeno que deseamos demostrar. Dicho anticuerpo se halla conjugado con el marcador (fluorocromos o metales electrodenso), el cual, directamente o tras una serie de reacciones histoquímicas, se hace "visible" al microscopio.

Como ventaja de este método podríamos señalar que la aplicación de una sola incubación con anticuerpo reduce la posibilidad de aparición de uniones inespecíficas, al mismo tiempo que representa una técnica de rápida ejecución. La desventaja sería que utiliza anticuerpos conjugados con marcadores, lo que puede suponer una alteración de la molécula de Inmunoglobulina, pudiéndose ver afectadas su afinidad o especificidad. Otro aspecto negativo es la necesidad de disponer de tantos anticuerpos marcados como antígenos queramos demostrar.

b) Métodos indirectos:

En ellos el primer anticuerpo utilizado, que es específico para el antígeno que queremos demostrar, no se halla conjugado con el marcador (aunque en algunas variantes de estos

métodos se encuentra conjugado con diversas sustancias, con el fin de poder prolongar la cadena de enlaces específicos entre el antígeno y el marcador), por lo que debemos utilizar un segundo anticuerpo (Ig), desarrollado en un animal de diferente especie que el primero, frente al primer anticuerpo. El segundo anticuerpo puede estar marcado o no; en este último caso, se prolonga la cadena utilizando un nuevo anticuerpo, desarrollado en la misma especie animal que el primero, el cual nos permitirá alcanzar el último eslabón, es decir, el marcador.

Los métodos indirectos aventajan a los directos en que son más sensibles, pero la aplicación de diferentes anticuerpos en una misma técnica aumenta el riesgo de uniones inespecíficas y además son, por el número de pasos, más laboriosos; al mismo tiempo, no se requiere disponer de una batería de anticuerpos primarios marcados.

Dentro de los procedimientos indirectos, y partiendo de la forma más simple (dos capas de anticuerpos), se han descrito diversas variantes, teniendo presente que cada una de ellas tiene sus ventajas y sus inconvenientes, por lo que deberemos elegir en cada caso el procedimiento más idóneo.

En nuestro trabajo hemos utilizado dos métodos indirectos en 3 pasos: el ABC y el B-SA.

El método de detección por medio del complejo Avidina-Biotina (ABC) es un procedimiento muy sensible que se basa en la elevada afinidad que poseen entre sí las moléculas de Biotina y las de Avidina, de forma que se genera un fuerte enlace no inmune.

La avidina es una glicoproteína de PM 68.000 que presenta una afinidad de  $10^{-15} \text{ M}^{-1}$  por la molécula de la vitamina Biotina <sup>\*(222)</sup>. Puesto que esta afinidad es más de un millón de veces superior que la de los anticuerpos por muchos antígenos, la unión de la Avidina a la Biotina es esencialmente irreversible.

Además de la elevada afinidad, el sistema ABC se puede utilizar con gran efectividad debido a que los 4 sitios de unión que presenta la Avidina para la Biotina y otras proteínas (que incluyen anticuerpos y enzimas) pueden conjugarse con distintas moléculas de Biotina.

Este método fue introducido en 1981 para localizar una gama de antígenos histológicamente significativos y otros marcadores de interés biológico <sup>\*(223,224)</sup>.

La técnica emplea anticuerpos primarios no marcados, seguidos de un anticuerpo secundario biotinado y en un tercer paso utiliza un complejo macromolecular preformado con avidina y peroxidasa de rábano picante biotinada.

Aunque la estructura del macrocomplejo todavía no se ha definido, existen datos que sugieren que está constituido por varias moléculas de peroxidasa de rábano picante biotinada que se une mediante reacciones cruzadas a la Avidina en un anillo tridimensional. El complejo tiene, aparentemente, pocos residuos de Biotina expuestos, pero presenta al menos un sitio de unión. La formación del complejo se produce mezclando Avidina con la peroxidasa en una solución de PBS. Después de la incubación inicial parece que se produce un cambio en el complejo a juzgar por el incremento en la sensibilidad de la tinción.

La elevada sensibilidad y los cortos tiempos de incubación que se requieren se podrían atribuir al número de moléculas activas de peroxidasa asociadas al complejo y a la rápida e irreversible interacción de dicho complejo con el anticuerpo biotinado.

La escasa tinción de fondo que proporciona el sistema se debe probablemente a las elevadas diluciones del suero primario y los demás reactivos utilizados en el método.

A diferencia de la técnica PAP, la cual requiere el uso de anticuerpos peroxidasa-antiperoxidasa obtenidos de diferentes especies, el método ABC utiliza un anticuerpo secundario biotinado general y un complejo Avidina-peroxidasa universal <sup>(223)</sup>. Este hecho es importante ya que los anticuerpos antiperoxidasa obtenidos de distintas especies no están siempre disponibles. Además, en la técnica PAP, el anticuerpo "puente" o de "unión" debe presentar al menos uno de sus dos sitios de unión al anticuerpo disponible para reaccionar con el complejo PAP, por lo que se requiere un exceso de este reactivo para obtener la máxima sensibilidad. Puesto que la Biotina unida al anticuerpo secundario sirve como "puente" en la técnica ABC, se necesita mucha menos cantidad de anticuerpo y, además, a diferencia de la unión Antígeno-anticuerpo, la unión Avidina-Biotina es irreversible <sup>(224)</sup>.

El segundo sistema de detección utilizado en nuestro estudio es el B-SA (sistema Biotina-Streptavidina amplificado). Este sistema utiliza la Streptavidina como sustituto de la Avidina porque presenta las siguientes ventajas: 1.-La streptavidina no contiene Hidratos de Carbono que podrían unirse inespecíficamente a sustancias semejantes a Lectinas que se pueden encontrar en tejidos normales como riñón, hígado, cerebro o células gigantes <sup>(225,226)</sup>. 2.-El punto isoeléctrico de la Streptavidina está próximo a la neutralidad, mientras

que la Avidina tiene un punto isoeléctrico de 10; como consecuencia, los conjugados de Streptavidina no exhibirán los efectos de las uniones inespecíficas característicos de los conjugados de Avidina, los cuales presentan cargas positivas en condiciones fisiológicas. Además, en el sistema B-SA la enzima está directamente conjugada con la Streptavidina, lo que da como resultado un reactivo más estable (con una vida media que sobrepasa el año) en contraste con el sistema ABC que debe prepararse inmediatamente antes del uso.

El sistema utilizado en nuestro trabajo (StraviGen Super Sensitive Detection System; Laboratorios BioGenex; 4600 Norris Canyon Road, San Ramon CA 94583) utiliza un anticuerpo puente modificado de tal forma que permite la unión de un mayor número de moléculas de Biotina sin que esto afecte a la afinidad de unión; por otra parte, el procedimiento de conjugación de la enzima marcadora a la Streptavidina permite el máximo marcaje de dicha molécula con varias enzimas. El efecto combinado de estos dos hechos incrementa notablemente la señal generada por la unión antígeno-anticuerpo con respecto a cualquier otro sistema indirecto de detección.

Para una máxima sensibilidad se prefiere utilizar como enzima marcadora la Fosfatasa Alcalina a la Peroxidasa, ya que los sustratos utilizados con la primera tienen un turnover y un coeficiente de extinción mayor <sup>(227)</sup>.

Los sistemas de revelado son el último paso en cualquier técnica inmunohistoquímica.

El revelado de la peroxidasa se lleva a cabo mediante la producción de un precipitado insoluble local, por acción de la enzima con su sustrato, el peróxido de oxígeno, para formar un complejo PR-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual reacciona sobre una sustancia, el cromógeno, capaz de

ceder electrones, originándose una molécula coloreada, que es el precipitado observado al microscopio. Completado el ciclo, de nuevo la peroxidasa reacciona con más sustrato, produciendo de nuevo precipitado coloreado, amplificándose así la reacción.

Como cromógeno se pueden utilizar distintas sustancias, en nuestro trabajo hemos utilizado la Diaminobencidina (DAB); la solución de DAB no debe contener azida sódica, ya que ésta actuaría como inhibidor competitivo de la peroxidasa.

En el método de tinción de la Fosfatasa Alcalina, la enzima hidroliza los ésteres de naftol fostato (sustrato) a compuestos fenólicos y fosfatos. Los compuestos fenólicos se unen a sales de diazonio incoloras (cromógenos) para dar lugar a estructuras azo insolubles y coloreadas.

## **4.2. Características biológicas de los marcadores tumorales utilizados.**

### *4.2.1.- Marcadores hormonales.*

Uno de los avances más significativos en el campo del cáncer de mama ha sido el descubrimiento de receptores hormonales. Se sabe desde hace tiempo que la presencia de receptores de estrógenos y progesterona en el cáncer mamario tienen significado en la evaluación del pronóstico a largo plazo y en las estrategias terapéuticas <sup>\*(228)</sup>. El primero en señalar fluctuaciones en la proliferación tumoral durante las diferentes fases del ciclo menstrual fue Cooper en 1836 <sup>\*(229)</sup>. La idea de que pudiera haber conexión entre los ovarios y el cáncer de mama fue publicada por Schinziger en 1889 y Beatson en 1896 <sup>\*(52,230)</sup>; sin embargo tuvieron

que pasar más de 60 años hasta que se pudo demostrar que los estrógenos estaban concentrados en tejidos que respondían a estas hormonas <sup>\*(231,232)</sup>, y que esta concentración se debía a la presencia de una proteína específica, "el receptor de estrógenos" que unía estrógenos con elevada afinidad <sup>\*(233)</sup>.

Para poder observar una respuesta a la estimulación estrogénica o una pérdida de esa respuesta, el receptor debe estar presente <sup>\*(101)</sup>, pero no todos los tejidos que contienen receptores para estrógenos presentan respuesta hormonal <sup>\*(228)</sup>. La síntesis del receptor de progesterona está inducida por estrógenos en los tejidos reproductores normales y en las líneas celulares de carcinoma mamario en cultivo <sup>\*(234,235)</sup>. Este hecho es consistente con la observación de que la determinación del receptor de progesterona además de la del receptor de estrógenos aumenta el valor predictivo de las determinaciones y que el receptor de progesterona parece ser un mejor indicador pronóstico que el receptor de estrógenos puesto que es uno de los productos finales de la acción estrogénica <sup>\*(73,236,237)</sup>.

Las bases moleculares de la sensibilidad de los carcinomas de mama a las manipulaciones hormonales se demostraron en 1971. Se encontró que había proteínas intracelulares en los tejidos hormona-dependientes que unían específicamente estrógenos y que podrían ser utilizadas para identificar cánceres mamaros hormono-sensitivos <sup>\*(238)</sup>.

Los estudios posteriores del proceso celular demostraron que la proteína receptora de estrógenos en el citoplasma probablemente se localizaba próxima a la membrana nuclear; los estrógenos procedentes del tráfico intercelular y otras hormonas esteroides, entran libremente en el citoplasma y cuando esto ocurre se unen a su receptor. Este complejo es entonces

transportado al núcleo donde estimula al DNA para iniciar la síntesis proteica, el crecimiento y la proliferación celular.

Entre las proteínas producidas en respuesta a la estimulación estrogénica se encuentra la proteína receptora de progesterona, la cual atrapa y procesa la progesterona circulante de forma similar a los estrógenos.

La presencia de ambos receptores es una evidencia adicional de que los mecanismos para el procesamiento de estrógenos está intacto <sup>\*(239)</sup>.

Actualmente se admite que todas las formas del receptor de estrógenos y progesterona se localizan en el núcleo celular <sup>\*(105,240,241)</sup>. Existen al menos dos formas de receptores de estrógenos específicos; el primero de ellos, el receptor en forma "libre" no se encuentra unido a las hormonas endógenas y es fácilmente extraíble de tejidos homogeneizados mediante buffers de baja fuerza iónica. Este tipo de receptor es el que se determina rutinariamente en las muestras histológicas obtenidas mediante biopsia o resección quirúrgica (RE citosólico). La otra forma del receptor de estrógenos, la "ocupada" se encuentra unida a estradiol endógeno y es extraíble únicamente mediante buffers de alta fuerza iónica. Este último tipo es, presumiblemente, el responsable más directo de las respuestas moduladas por hormonas que se observan en los tejidos <sup>\*(105)</sup>.

Existe una correlación significativa entre la concentración de la forma citosólica y nuclear y esto indica que ambos tipos están en equilibrio en los tejidos intactos.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores de estrógenos y progesterona a partir de las líneas celulares MCF-7 y T47D <sup>(242,243)</sup> ha permitido la puesta a punto de nuevos métodos de determinación que difieren de las técnicas bioquímicas originarias <sup>(240)</sup>; mientras que estas últimas se basan en la unión del receptor a radioligandos, las técnicas que utilizan anticuerpos monoclonales se basan en la unión del anticuerpo al receptor. Las técnicas bioquímicas detectan las formas "libres" de los receptores en los homogeneizados tisulares, mientras que las técnicas inmunohistoquímicas detectan receptores en forma "libre y ocupada".

En nuestro estudio hemos utilizado exclusivamente técnicas inmunohistoquímicas para la demostración del receptor de estrógenos y progesterona puesto que permiten la detección en tejidos fijados o congelados que son el material habitual en nuestro Centro.

Los anticuerpos monoclonales producidos contra los receptores humanos se aplican en secciones tisulares y utilizan sistemas de detección altamente sensibles que permiten, además, la visualización de las uniones anticuerpo-receptor.

Comparando estos métodos de detección con los bioquímicos se observa que los ensayos inmunohistoquímicos son más rápidos, la cantidad de tejido requerida para la demostración de receptor es menor y además se puede estimar la potencial heterogeneidad del tumor, parámetro que se supone de importancia clínica, pero del cual todavía no existen datos que validen esta expectativa. Como contrapartida, la principal desventaja de los métodos de detección inmunohistoquímicos es que sólo permiten valoraciones semicuantitativas.

La correlación entre los métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos es excelente y así lo demuestran distintos autores en las distintas publicaciones que se centran en este tipo de estudios <sup>\*(244,245,246,247)</sup>.

Los anticuerpos dirigidos contra el receptor de progesterona humano no han estado disponibles en el mercado hasta hace aproximadamente una década <sup>\*(243)</sup> y han permitido la valoración tisular de los mismos de manera análoga a la utilizada para demostrar los receptores de estrógenos, sin embargo, y debido a la corta experiencia en su utilización, todavía son pocos los datos que hacen referencia a su utilidad clínica y terapéutica<sup>\*(247)</sup>.

En los estudios clínicos el receptor de estrógenos se ha encontrado en el 50-85% de todos los cánceres de mama <sup>\*(213)</sup>. Su presencia estaba correlacionada con la edad de la paciente, y además, estaba más frecuentemente presente (a mayores concentraciones) en las mujeres postmenopáusicas que en las premenopáusicas <sup>\*(248)</sup>.

Es raro que el receptor de progesterona se detecte cuando el receptor de estrógenos no está presente y, habitualmente, el receptor de progesterona aparece cuando el de estrógenos está presente a altas concentraciones. Por otra parte, y por razones que aún no están claras, no se ha encontrado correlación entre la expresión del receptor de progesterona con la edad o el estatus menopáusico <sup>\*(249,250,251)</sup>.

La presencia del receptor de estrógenos en los cánceres de mama, y especialmente la presencia de este receptor junto con el de progesterona, identifica tumores que tienen una elevada probabilidad de responder a terapia hormonal o endocrina. Los tumores con receptores de estrógenos positivos responden favorablemente a este tipo de terapias en un 60% de los

casos aproximadamente, mientras que cuando los dos receptores están presentes este porcentaje se eleva al 70-75%. Tan solo un 10% de los tumores con receptores estrogénicos negativos responden a este tipo de tratamiento <sup>\*(252,253)</sup>.

La presencia de receptores para estrógenos y progesterona se asocia con varios hallazgos histológicos y de cinética celular que sugieren un pronóstico favorable; los tumores con los receptores para estrógenos positivos suelen ser mejor diferenciados histológicamente, no suelen presentar necrosis tumoral, y suelen tener un buen grado nuclear <sup>\*(250,251)</sup>. Además, los estudios de proliferación indican que los tumores con este tipo de receptores positivos presentan un bajo índice de marcaje con timidina triatada y de la fracción de la fase S <sup>\*(254,255)</sup>.

Como factor pronóstico, el estatus del receptor de estrógenos parece ser independiente de los elementos que contribuyen al estadio clínico y patológico; en muchos estudios no se ha encontrado ninguna correlación con el estadiaje clínico TNM <sup>\*(256,257,258)</sup>, ni tampoco se ha encontrado que el status del receptor prediga la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios axilares <sup>\*(257,259,260)</sup>, aunque las pacientes con ambos receptores positivos y con afectación ganglionar axilar, parecen presentar un menor número de metástasis <sup>\*(251)</sup>.

La asociación entre la presencia de receptor de estrógenos y un curso clínico mas favorable de las pacientes con cáncer de mama, fue reconocida por primera vez en 1977; también se encontró que el tiempo de recurrencia de la enfermedad tras la mastectomía en las pacientes con los receptores positivos era mayor <sup>\*(261)</sup>, y que esta reducción en la recurrencia temprana era independiente del status de los ganglios axilares, la edad y el tamaño del tumor. La recurrencia a los 18 meses es dos veces mas frecuente en las pacientes con el receptor de

estrógenos negativo que en las pacientes con el receptor positivo y el intervalo de supervivencia libre de enfermedad a los 30 meses es un 20% superior en estas últimas.

Esta reducción de la recurrencia temprana es estadísticamente significativa en pacientes con mas de cuatro ganglios afectados que constituyen un grupo en el cual la recurrencia tiende a ser temprana y en el que cualquier influencia tiene mas posibilidades de ser detectada.

La presencia de receptores positivos para estrógenos y progesterona parece estar asociada con un buen pronóstico, y los tumores que presentan ambos receptores positivos tienen, en alguna manera, un curso mas favorable. Sin embargo algunos autores concluyen que el receptor de progesterona no mejora significativamente el valor predictivo obtenido por la medida del receptor de estrógenos solo <sup>\*(262,263)</sup>.

Son muchos los autores que han tratado de concretar las implicaciones pronósticas de los receptores hormonales en relación con otros indicadores biológicos implicados en el pronóstico, utilizando para ello análisis multivariantes. Sus conclusiones son controvertidas, pero lo que si parece estar aceptado por todos ellos es que algunos índices de proliferación tienen mayor utilidad pronóstica que la actividad de los receptores <sup>\*(262)</sup>.

En pacientes con periodos largos de seguimiento se ha encontrado que las diferencias observadas en el intervalo libre de enfermedad en las pacientes con receptores de estrógenos positivos frente a las pacientes con receptores negativos desaparece a los 5-8 años, y las diferencias de supervivencia también disminuyen <sup>\*(264,265)</sup>.

De todo lo expuesto anteriormente podríamos concluir que:1.- el estadiaje clínico y patológico continúan siendo los principales instrumentos para establecer el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama, 2.- la afectación de ganglios nos aporta la información mas importante en estadíos tempranos, 3.- el estatus de los receptores para estrógenos y progesterona en el tejido tumoral nos aporta una información muy útil para seleccionar tratamiento hormonal y además tiene relevancia pronóstica, y 4.-la evolución favorable de las pacientes con tumores positivos para estos receptores parece derivar tanto de los efectos de la terapia endocrina como de una biología tumoral mas favorable, en alguna medida, aunque esta tendencia se vea reducida a lo largo del tiempo.

#### *4.2.2. Marcadores de proliferación celular.*

El interés de los histopatólogos en establecer la capacidad de proliferación de las células tumorales data del siglo pasado. En la actualidad se acepta que la medida de la proliferación celular aporta una información muy útil en lo que se refiere al pronóstico y al diagnóstico tumoral y que la cinética celular influye directamente en el curso clínico de los pacientes con tumores malignos <sup>(78)</sup>.

El principal problema ha sido establecer las variables que reflejan con éxito el grado de proliferación y correlacionarlas con el potencial metastásico del tumor, la recurrencia de la enfermedad y la mortalidad. Muchos investigadores han centrado sus trabajos en estos objetivos, pero muy pocos han podido responder a cuestiones básicas como son establecer las tasas reales de la proliferación y crecimiento tumoral, conseguir que las medidas utilizadas

sean reproducibles entre los distintos grupos de trabajo y que estas medidas sean significativas cuando se comparan con otros factores de interés pronóstico.

Antes de revisar las distintas técnicas que existen para poder medir la proliferación celular, recordaremos muy brevemente el ciclo celular: las células en proliferación pueden ocupar distintos estadios funcionales antes de dividirse. Después de que una célula haya completado la mitosis, las células hijas entran en fase G1, en la cual permanecen un periodo variable en función del tipo de tejido. A continuación las células entran en fase S o de síntesis, en la cual tiene lugar la duplicación del DNA. Las células que no duplican el material genético entran en un estadio de reposo especializado, denominado G0. Tras la duplicación del DNA las células entran en G2, durante este periodo la célula se asegura de que la replicación ha sido completa y correcta antes de volver a dividirse. El tiempo transcurrido entre dos mitosis se denomina "ciclo celular" y varía ampliamente en función de la duración de la fase G1.

Los métodos que analizaremos a continuación se idearon con el fin de cuantificar los distintos aspectos del ciclo celular y relacionar estas medidas con el desarrollo biológico de las células.

#### 1. Contaje mitótico:

Quizá este método sea el más eficaz y el más ampliamente utilizado. El contaje mitótico se define como el número de mitosis por diez campos de alto poder (HPFs). Es importante distinguir entre el contaje mitótico y el índice mitótico, ya que éste último es la fracción de mitosis expresadas como porcentaje.

El conteo mitótico ha sido, y sigue siendo utilizado por los histopatólogos como una ayuda al diagnóstico y como un indicador pronóstico en el estudio de la patología tumoral.

A pesar de su utilización habitual, la validez de este parámetro como marcador de la actividad proliferativa de un tumor es controvertida. Muchos autores están de acuerdo en que el conteo mitótico es el indicador más fiable para predecir la evolución de un tumor, pero difieren en la cantidad de mitosis por 10 HPFs que son realmente indicativos para un diagnóstico de malignidad <sup>(266)</sup>. En lo que sí están de acuerdo es en la importancia de una muestra adecuada para establecer la actividad mitótica de un tumor.

Burns y colaboradores <sup>(267)</sup> señalan una buena correlación entre el incremento de la actividad mitótica y el desarrollo agresivo del tumor, pero concluyen que este hecho microscópico aislado no es uniformemente predictivo del pronóstico y hacen hincapié en el problema de las variaciones encontradas en el conteo por distintos observadores. Este hecho ya había sido señalado por Sylverberg <sup>(120)</sup> que ya expresó el interés de este parámetro como único indicador de malignidad <sup>(268)</sup>.

Las razones propuestas para estas variaciones incluyen la elección correcta de la región más activa de la sección histológica, la distinción clara entre figuras mitóticas y núcleos picnóticos y por último la elección correcta de los campos estudiados.

El conteo mitótico también ha sido criticado por el hecho de que el área de un único HPF puede variar al menos en 6 veces en los distintos microscopios, lo que significaría que un mismo tumor analizado en diferentes instrumentos podría hacer variar el conteo entre 3-20 mitosis por 10 HPFs. Para solucionar estos problemas, algunos autores proponen que el

contaje se realice en portas calibrados con el fin de estandarizar los resultados <sup>(269)</sup>. Aplicando este método a un estudio de 10 casos de linfomas no Hodgkin (NHL), Donhuijsen encontró que si el área estudiada y el grosor del corte eran constantes, el grado de reproductibilidad dependía, en gran medida, de la experiencia del observador <sup>(119)</sup>.

Por otra parte, el contaje mitótico no tiene en cuenta el tamaño celular: un HPF o en su defecto un porta calibrado para el estudio de un tumor de células grandes contendría menos cantidad de células que un tumor de células pequeñas, y así, al comparar contajes de distintos tumores se obtendrían diferencias en las medidas. Por esta razón el índice mitótico, aunque supone un gasto mayor de tiempo en lo que se refiere a su realización, es el método preferido para establecer la actividad mitótica.

De lo anteriormente expuesto se puede concluir que el contaje mitótico no es un método estandarizado <sup>(270)</sup>, y, además, no es reproducible, incluso aunque la variación entre distintos observadores pudiera ser eliminada. El contaje mitótico no se puede contemplar como un parámetro independiente de la proliferación celular, y la actividad mitótica de un tumor sólo puede ser interpretada en el contexto de otros hallazgos clínicos y patológicos.

## 2. Índice de marcaje con Timidina.

El índice de marcaje con timidina (TLI) es la medida del porcentaje de células tumorales en fase S del ciclo celular. Este índice se mide "in vitro" incubando el tejido tumoral, excindido en fresco, en un medio que contiene timidina tritiada, la cual se incorpora al DNA. Posteriormente se realizan autorradiografías, se cuentan las células marcadas y se comparan con las no marcadas, esto es, con la población en interfase.

Puesto que la fase S es más larga que la fase M, el TLI también es mayor que el índice mitótico y, supuestamente, más fiable.

Esta técnica fue aplicada por primera vez al estudio del cáncer de mama en 1961 por Johnson, quién demostró el incremento del TLI en fibroadenomas <sup>\*(271)</sup>; desde entonces, todo el interés se ha centrado en el papel de el TLI como indicador pronóstico en el cáncer de mama.

Distintos grupos de investigadores han demostrado una correlación significativa entre un alto TLI y la recurrencia temprana tras la mastectomía <sup>\*(272,273,274)</sup>.

La utilidad del TLI como indicador de la actividad proliferativa tumoral tiene serias limitaciones, entre las que hay que destacar que este índice informa del número de células en fase S, pero no aporta información de la duración de esta fase. Es posible que un tumor tenga un bajo grado de proliferación, y un alto TLI <sup>\*(275)</sup>.

Por otra parte, algunos tumores desarrollan patrones de crecimiento heterogéneos y se argumenta que un método que se basa en una muestra de una parte de un tumor, puede ser, como mucho, solo un índice imperfecto de la capacidad proliferativa de ese tumor <sup>\*(276)</sup>.

Por último, como en cualquier técnica que requiere contaje celular, las variaciones entre los distintos observadores, el error de reproductibilidad y el tamaño de la muestra pueden conducir a resultados dispares. Otro problema adicional es la definición de las células marcadas en las autorradiografías, y también hay que recordar los inconvenientes que presenta la incorporación de la timidina, fundamentalmente "in vitro" <sup>\*(277)</sup>.

En resumen, la medida del TLI requiere tejido en fresco, es larga, necesita autorradiografía y no es una técnica que se pueda aplicar de rutina en los laboratorios, por lo que, desde un punto de vista práctico, esta técnica se debe restringir a situaciones en las cuales es el único método efectivo para predecir el desarrollo de un tumor, como por ejemplo en ciertas discrasias de células plasmáticas.

### 3. Marcaje con Bromodeoxiuridina.

El índice de marcaje de la fase S también se puede medir utilizando Bromodeoxiuridina (BUdR).

La BUdR es un análogo de la pirimidina que se incorpora naturalmente en las células durante la síntesis del DNA; la Bromodeoxiuridina aumenta la sensibilidad de la células a los rayos X, y se utiliza de forma habitual en radioterapia.

Recientemente se han desarrollado anticuerpos monoclonales para la BUdR <sup>(278,279)</sup>. Los tumores que se han expuesto a este marcador "in vivo" o "in vitro" se tiñen con el anticuerpo utilizando la técnica de la inmunoperoxidasa. Las células teñidas se cuentan utilizando un microscopio de fase, y, el índice de marcaje se expresa como el porcentaje de 500 ó 1.000 células tumorales por campo.

Este método tiene una serie de ventajas sobre el marcaje con timidina, ya que al ser la primera un agente terapéutico "in vivo", los estudios cinéticos se pueden realizar sin necesidad de procedimientos adicionales y se evita también la exposición a agentes radioactivos.

Por otra parte, este método es más rápido, y más susceptible de ser incorporado a los laboratorios como técnica de rutina.

#### 4. AgNORs.

Las regiones de organización nucleolar (NORs) son lazos de DNA que transcriben para RNA ribosómico <sup>(280)</sup>. Estas regiones se localizan en cromosomas acrocéntricos, de los cuales, la especie humana, presenta 5 pares <sup>(281)</sup>. Cada cromosoma acrocéntrico porta dos NORs, y así, una célula diploide normal podría contener 20 de estas regiones.

Las regiones NORs se pueden demostrar utilizando "hibridación in situ" para localizar genes ribosomales <sup>(282)</sup>. Estas regiones, además, están asociadas a distintas proteínas incluyendo la RNA polimerasa I, C23 y B23. Estas proteínas se conocen como antígenos NOR y se cree que desempeñan alguna función en la transcripción <sup>(283)</sup>.

En 1975 se descubrió que estas regiones se podían demostrar utilizando las propiedades argirófilas de sus proteínas asociadas, por medio de tinciones de plata. Posteriormente, la técnica fue modificada, y actualmente se conoce como la técnica de los AgNORs, y se puede aplicar a los tejidos fijados y embebidos en parafina <sup>(284)</sup>.

No se conoce con exactitud que se mide realmente en el contaje de AgNOR, y además, existe una marcada discrepancia entre los contajes en ciertas células benignas comparadas con el número que se esperaría encontrar en células diploides normales. Este hecho se podría explicar teniendo en cuenta que los cromosomas se desorganizan durante la interfase, por lo que sólo se observaría una única estructura teñida de plata en las células

en G0. Los cromosomas se individualizan y dispersan en metafase y los AgNORs se pueden identificar individualmente <sup>\*(285)</sup>; y sería por este motivo que el conteo de AgNOR variaría en función de la fase del ciclo celular.

Un problema adicional se deriva de la propia apetencia del nucleolo por la plata, lo que puede ocasionar dificultades añadidas en el conteo preciso y por otra parte dar lugar a variaciones entre los distintos observadores <sup>\*(286)</sup>.

#### 5. Citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica automatizada que cuantifica el contenido del DNA celular y analiza la distribución del ciclo celular <sup>\*(124,287)</sup>.

Básicamente la técnica consiste en teñir una suspensión celular, obtenida de una muestra de tejido, con fluorocromos específicos para DNA. La suspensión fluye entonces por unos detectores a razón de unas 5.000 células por segundo. La fluorescencia emitida por las células se registra en estos detectores y se convierte en señales electrónicas que son analizadas por un ordenador, el cual, a su vez, realiza el histograma del DNA.

El contenido del DNA celular, conocido como el estado de ploidía, se expresa como "índice de DNA" y nos informa de la cantidad de células en G0/G1 de la población en estudio, en comparación con un patrón interno o externo de células diploides.

Las células diploides tienen un índice de DNA de 1.00; las células con un índice de DNA de 2.00 son tetraploides y las que muestran un índice superior a éste son aneuploides o poliploides.

El contenido de la fase S y la actividad proliferativa (S+G2M) de la muestra se puede determinar descomponiendo el histograma.

Esta técnica se puede aplicar a material fresco o embebido en parafina <sup>\*(288)</sup>.

Muchos tumores se muestran homogéneos en lo que se refiere a la ploidía, pero, ocasionalmente, se pueden identificar poblaciones diploides entre las células aneuploides del tumor. Este hecho se debe fundamentalmente, a la presencia de células del estroma y a linfocitos reactivos, pero también puede representar heterogeneidad tumoral.

En el cáncer de mama la aneuploidía se observa en el 90% de los tumores <sup>\*(289)</sup>. Los tumores benignos de mama tienen un contenido diploide de DNA, pero la ploidía tumoral no se puede utilizar para diferenciar los tumores benignos y malignos <sup>\*(290)</sup>.

El grado de diferenciación de un tumor se correlaciona bien con la ploidía; los tumores diploides tienden a una mayor diferenciación, y es posible que el status de ploidía sirva como alternativa a los actuales sistemas de gradación histológica <sup>\*(291)</sup>.

En resumen, la citometría de flujo es un método de análisis del DNA rápido, seguro y reproducible; se puede aplicar a material fresco o fijado y embebido en parafina, lo que permite estudios retrospectivos de material de archivo, pero presenta como principal

inconveniente que los suspendidos celulares obtenidos a partir de un tumor están frecuentemente contaminados con células no tumorales.

## 6. Métodos inmunohistoquímicos.

La ventaja de estos métodos para medir la proliferación celular, en comparación con los analizados anteriormente, reside en que son más sencillos de realizar, no requieren aparataje especial y están plenamente incorporados en los laboratorios como técnicas de rutina <sup>\*(125)</sup>.

En la actualidad existen muchos anticuerpos disponibles en el mercado que se pueden utilizar para la medida del ciclo celular, aunque el pionero y el prototipo es el anticuerpo monoclonal Ki-67 <sup>\*(126)</sup>. Este anticuerpo reconoce una proteína nuclear de 395 y 345 Kd. que se expresa en todo el ciclo celular menos en G0 <sup>\*(129,292)</sup>.

El marcaje con Ki-67 se correlaciona bien con la proliferación celular, determinada, por ejemplo con timidina tritiada, y con el grado histológico y el pronóstico en los linfomas no Hodgkin <sup>\*(126,293)</sup>.

La principal limitación de este anticuerpo es que se ha de utilizar en tejido fresco, ya que la fijación anula la tinción en la mayoría de los casos <sup>\*(294)</sup>.

El diagnóstico directo y la independencia de este anticuerpo como marcador de valor pronóstico ha sido objeto de estudio en múltiples trabajos, entre los que cabe destacar el de Gerdes de 1990, o el de Hall y Woods de la misma fecha <sup>\*(295,296)</sup>.

Utilizando partes recombinantes del antígeno Ki-67 como inmunógeno, Cattoretti y su grupo produjeron dos años más tarde algunos anticuerpos nuevos, tres de los cuales, designados MIB 1-3, se han caracterizado como verdaderos equivalentes del Ki-67, mediante inmunotinción de secciones congeladas y por métodos de biología molecular <sup>(150)</sup>.

La aplicación de estos nuevos anticuerpos para la inmunotinción de rutina en secciones fijadas y embebidas en parafina fue inicialmente controvertida; sin embargo, un estudio reciente sobre el método de desenmascaramiento antigénico por medio de altas temperaturas en microondas, indujo a seguir investigando sobre la capacidad del Ki-67 y los anticuerpos MIB 1-3 para reconocer al antígeno Ki-67 en muestras fijadas <sup>(110)</sup>.

La comparación de las características inmunohistoquímicas y bioquímicas de estos anticuerpos para demostrar que son verdaderos equivalentes del Ki-67, ha sido objeto de estudio de varios grupos de investigación. Gerdes y su equipo utilizaron anticuerpos que eran IgG1k, y como inmunógenos, para MIB-1 y MIB-3, utilizaron una proteína recombinante que incluía una parte de la proteína Ki-67, denominada X2/1 que contiene 3 de las 16 secuencias repetidas (Ki-67 motifs) que aparecen en la proteína Ki-67, y que fue aplicada como inmunógeno después de su completa desnaturalización. El inmunógeno utilizado para generar el anticuerpo original Ki-67 se obtuvo aislando núcleos de las líneas celulares L428.

Los datos obtenidos por este grupo se resumen en la tabla siguiente:

TABLA XVII				
Anticuerpo	Subclase	Inmunogeno	Detección de la prot.Ki-67	
			Congelación	Parafina+MO
Ki-67	IgG 1k	Núcleo L428	+	-
MIB-1	IgG 1k	X2/1	+	+
MIB-3	IgG 1k	X2/1	+	+

En las secciones congeladas de tejidos en proliferación, como amígdala, todos los anticuerpos mostraban el mismo patrón de tinción. En las secciones fijadas y embebidas en parafina sólo los anticuerpos MIB-1 y MIB-3 podían teñir las células en proliferación, tras el tratamiento de las secciones en microondas.<sup>\*(297)</sup>

Por otra parte Cattoretti y su grupo realizaron un estudio similar. La serie de anticuerpos MIB se preparó fusionando células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con partes recombinantes del antígeno Ki-67 con células de mieloma de la línea celular X63Ag8.653.

Los resultados obtenidos por este grupo fueron idénticos a los obtenidos por el equipo de Gerdes. Mientras que la expresión de Ki-67 eran constantemente negativa en secciones fijadas y embebidas en parafina, los anticuerpos MIB-1 y MIB-3 teñían fuertemente los núcleos de las células en proliferación, y el patrón de tinción era el mismo que el observado con Ki-67 en secciones congeladas.<sup>\*(150)</sup>

En resumen, el patrón de tinción nuclear que se observa en las secciones embebidas en parafina, siguiendo el método de desenmascaramiento antigénico con microondas, con los anticuerpos MIB-1 y MIB-3, coinciden con los obtenidos utilizando el anticuerpo Ki-67 en tejido congelado <sup>(126)</sup>, y con los resultados de proliferación en células normales obtenidos por incorporación de precursores de DNA marcado.

Esta nueva técnica presenta distintas ventajas sobre los otros métodos estudiados: 1.- se obtiene una combinación entre la fuerte inmunoreactividad y la buena preservación morfológica, lo que a su vez permite un reconocimiento de los detalles celulares y la posible identificación de grupos celulares positivos; 2.- los productos de la inmunorreacción son claros y nítidos, lo que permite una diferenciación real entre las células positivas y negativas, incluso cuando sólo se tiñe una mínima cantidad de antígeno; 3.- la técnica puede ser aplicada en todos los laboratorios ya que no necesita instrumentación especial.

Aunque existen algunas discrepancias en la literatura en lo que se refiere a la estimación de la fracción de crecimiento por medio de KI-67 en una población celular humana dada, numerosos estudios independientes indican que el índice de marcaje con Ki-67 es un marcador inmunocitoquímico de relevante valor pronóstico en el estudio de los tumores en la especie humana; y así por ejemplo, dentro del grupo de las enfermedades linfoproliferativas se ha encontrado una excelente correlación entre la expresión de Ki-67 y el grado histológico de los linfomas no Hodgkin <sup>(298)</sup>.

Dentro del grupo de tumores del sistema nervioso central, también se ha encontrado correlación entre la expresión de Ki-67 y el grado histológico y una mayor recurrencia en los casos con mayor positividad para este marcador <sup>(299)</sup>.

Por lo que se refiere al cáncer de mama, los estudios se han centrado en establecer las relaciones entre la fracción de crecimiento de los tumores y otras variables de utilidad pronóstica en el curso de la enfermedad. Estos estudios han revelado una buena correlación entre la tinción de Ki-67 con el contaje mitótico, el diámetro del tumor, el grado histológico, la afectación ganglionar y la invasión vascular <sup>\*(144,300,301)</sup>. Por otra parte, también se ha descrito una correlación inversa entre la expresión del receptor de estrógenos y la expresión de Ki-67 <sup>\*(302)</sup>.

Aunque los carcinomas bien diferenciados tienen un índice de Ki-67 menor que los pobremente diferenciados, hay una considerable disparidad y el índice de proliferación de los distintos grados histológicos se solapa <sup>\*(145)</sup>.

Por otra parte, algunos estudios no han encontrado ningún tipo de correlación entre la expresión de Ki-67 y algunos de los parámetros anteriormente citados <sup>\*(144,301)</sup>.

Otros trabajos han correlacionado el índice de marcaje con Ki-67 y la recurrencia temprana de la enfermedad, concluyendo que las pacientes con un índice elevado de Ki-67 (mayor del 20%) presentan un mayor riesgo de recurrencia <sup>\*(301)</sup>.

Otro antígeno ampliamente utilizado para la medida de la actividad proliferativa, es el antígeno nuclear de proliferación celular PCNA. Este antígeno es una proteína nuclear de 36 Kd. asociada a la DNA polimerasa delta que está presente en todo el ciclo celular <sup>\*(157)</sup>.

Esta proteína fue identificada independientemente por Miyachi en 1978 y por Bravo y Celis en 1980<sup>(154,303)</sup> y se describió como una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta que necesita de ATP para la replicación y reparación del DNA <sup>(304)</sup>.

También se demostró que la PCNA era esencial para la progresión del ciclo celular, y que los autoanticuerpos para PCNA ejercían un efecto inhibitorio en la síntesis del DNA y en la proliferación celular en los cultivos celulares <sup>(305)</sup>.

Las células eucariotas presentan dos formas de PCNA; una es extraíble con detergentes y se encuentra en las células en proliferación, pero no en las células en G0, y la otra variante es resistente a los detergentes y está asociada a los sitios de replicación y estrechamente asociada a la síntesis de DNA <sup>(306)</sup>.

Se han realizado distintos trabajos para validar la medida de la actividad proliferativa por PCNA, y se ha encontrado que la inmunoreactividad obtenida mediante este marcador es superior a la obtenida con timidina tritiada o citometría de flujo en el cáncer mamario <sup>(307,308)</sup>. Este fenómeno se podría explicar por el hecho de que los tejidos fijados en formol no solo exhibirían la fracción insoluble de PCNA unida a ribosomas activos, sino que también mantendrían las moléculas solubles de PCNA presentes en las células en proliferación que no estuvieran en fase S <sup>(309)</sup>.

Otros estudios sugieren que hay muy pocas variaciones en los niveles totales de PCNA a lo largo del ciclo celular, pero sí hay una gran alteración en la proporción de la proteína asociada a los sitios de replicación, particularmente en la fase S, y que la cantidad de PCNA presente en

el núcleo de las células en ciclo parece ser mayor que la que se requeriría para la síntesis del DNA <sup>(153)</sup>.

Por otra parte, la vida media de la proteína es de unas 20h. y podría ser detectada inmunológicamente en células que hubieran dejado el ciclo recientemente <sup>(306)</sup>.

Otros investigadores sugieren que distintos factores de crecimiento podrían inducir estabilidad al RNAm de PCNA y como consecuencia se observaría expresión de la proteína <sup>(310)</sup>.

La tinción de PCNA es casi exclusivamente nuclear, y puede presentar un patrón de distribución difuso o granular o una mezcla de ambos. En muy raras ocasiones se observa tinción citoplásmica, y la naturaleza de este hecho permanece aún sin desvelar, pero podría atribuirse a síntesis citoplásmica o a degradación. Las células en mitosis frecuentemente muestran una tinción difusa debido a la ruptura de la membrana nuclear durante esta fase del ciclo, y algunas de estas células no muestran tinción alguna para PCNA.

La distribución nuclear de la tinción de PCNA en material histológico no neoplásico es enteramente consistente con el hecho de que este antígeno esté asociado a la proliferación celular, ya que la tinción se ha observado en tejidos de probada actividad proliferativa como pueden ser los centros germinales o las células dispersas de la paracorteza del tejido linfoide, la capa basal del epitelio estratificado escamoso y en la mayoría de las células en bulbo piloso. También se ha encontrado tinción nuclear de PCNA en los compartimentos proliferativos del estómago, intestino delgado y colon. En el intestino delgado se observa una tinción débil y difusa en la zona de proliferación dentro de las criptas, y esta tinción disminuye según las células progresan hacia las vellosidades, donde desaparece.

Así mismo se ha observado inmunorreactividad para PCNA en el epitelio y en las células estromales en el endometrio proliferativo, pero no en el endometrio en fase secretora. En testículo la mayoría de las espermatogonias son positivas para este marcador, pero las espermatidas y espermatozoides son negativos lo mismo que las células intersticiales y las células de Sertoli.

Por el contrario, en los tejidos en los que actividad proliferativa es nula o tienen un turnover lento, la inmunorreactividad para PCNA es mínima, y así por ejemplo no se observa tinción de PCNA en el sistema nervioso central o periférico, tejido óseo, músculo liso no cardíaco o hepatocitos normales, aunque algunas células de Kupffer si muestran positividad para el marcador.<sup>\*(175)</sup>

La utilidad del PCNA como marcador de la actividad proliferativa en los tumores es controvertida, y la disparidad de criterios entre los distintos autores se debe tanto al escaso conocimiento de la biología de esta molécula y a la complejidad de los procesos en los que parece estar involucrada, como a la resistencia de ciertos epitopos a los procesos de fijación convencional de las muestras objeto de estudio. A pesar de esto, el valor pronóstico del antígeno de proliferación celular PCNA, se ha demostrado en distintos trabajos y se ha encontrado correlación entre este marcador y distintos indicadores pronósticos en tumores humanos y en el cáncer de mama <sup>\*(175,309,311-316)</sup>, si bien existen pocos datos publicados de estudios de seguimiento que correlacionen la asociación directa entre este marcador y la supervivencia <sup>\*(312,314)</sup>.

Simoneta Bianchi y su equipo, en un estudio de 173 casos de cáncer de mama sin afectación ganglionar, no han encontrado asociación entre PCNA y la edad de la paciente o el tamaño del

tumor, mientras que describen una correlación directa entre el marcador y el grado nuclear. Los mismos hallazgos se han descrito para linfomas nodales o gastrointestinales.<sup>\*(175,312,317)</sup>

Por otra parte, Steven R. Tahan y su grupo, en un artículo publicado en 1993 tampoco encuentran correlación entre este marcador y la edad, tamaño del tumor, o metástasis nodales, aunque si encuentran que el marcaje de PCNA aumenta con el índice mitótico y que las pacientes con tumores que muestran un alto índice de marcaje para PCNA tienen un intervalo libre de enfermedad más corto y una supervivencia total menor.<sup>\*(318)</sup>

Existen muy pocos estudios comparativos entre el marcaje inmunohistoquímico con PCNA y Ki-67 (MIB-1), pero en todos ellos los índices de marcaje con PCNA son superiores a los obtenidos con Ki-67. Este hecho se atribuye a que el PCNA no se expresa únicamente en las células en ciclo, si no a que también existen epitopos de este antígeno que parecen no estar involucrados en la proliferación celular <sup>\*(319)</sup>, y a la estabilidad que parecen conferir ciertos factores de crecimiento al RNAm, y en consecuencia a la expresión de la proteína, y a la regulación de la expresión de PCNA por factores paracrinós y autocrinós que se ha observado en ciertos tumores.<sup>\*(175)</sup>

#### *4.2.3. Antígenos de grupo sanguíneo.*

Los Hidratos de Carbono son los principales componentes de la cara externa de la superficie celular de los mamíferos y a menudo son característicos de los distintos tipos celulares. Estas estructuras cambian dramáticamente durante el desarrollo y en los distintos estadios de la

diferenciación se expresan sets específicos que, en muchos casos, se pueden reconocer mediante anticuerpos concretos, convirtiéndose así en antígenos de diferenciación <sup>(86,320)</sup>.

En los organismos maduros, la expresión de los distintos carbohidratos está eventualmente restringida a tipos celulares concretos, dando lugar a hidratos de carbono específicos de tipo celular. Las aberraciones en estos componentes están asociadas a varias condiciones patológicas incluyendo la transformación maligna. Actualmente se acepta que estos carbohidratos específicos de tipo celular están involucrados en las interacciones célula-célula.

En la transformación maligna, la alteración de los hidratos de carbono de superficie facilita la interacción de las células tumorales con otras células, lo que permite la diseminación del tumor y la metástasis.

Esencialmente, todas las células tumorales muestran distintos perfiles y estructuras de los carbohidratos de superficie celular de los que presentaban las células no alteradas de las que proceden.

Existen dos grupos químicamente distintos de hidratos de carbono que muestran cambios evidentes en las células tumorales; por un lado se encuentran los carbohidratos unidos a ceramidas (glicoesfingolípidos y glicolípidos) y por otro los que se unen a proteínas de superficie celular (glicoproteínas).

Durante los últimos 25 años ha existido un gran interés en descifrar los cambios observados en los glicoconjugados expuestos en las células tumorales en comparación con los de las células progenitoras. Estos cambios pueden resumirse en: 1.-procesos de síntesis incompleta con o

sin acumulación de precursores y procesos de neosíntesis para los glicolípidos, y, 2.- incremento de las ramificaciones, densidad y cambios en las regiones periféricas, para las glicoproteínas.

El cambio más frecuentemente encontrado en las células tumorales es la aparición de glicopéptidos de un peso molecular superior a los encontrados en las células no transformadas de las que proceden <sup>(321)</sup>. También se han detectado otros cambios en las estructuras tipo mucina O-glicosiladas, definidas por medio de la reactividad específica de algunos anticuerpos monoclonales para determinados tumores <sup>(322)</sup>.

El patrón de glicosilación anómala que puede caracterizar a un tipo de tumor en concreto puede estudiarse más fácilmente en los glicolípidos que en las glicoproteínas, ya que un glicolípido específico de un tumor se puede aislar como un componente único de la estructura y puede definirse con exactitud. Esta vía es más difícil para las glicoproteínas, puesto que los hidratos de carbono que las forman son heterogéneos.

Tanto la acumulación de precursores debida al bloqueo de la síntesis, como la presencia de neoglicolípidos debida a la neosíntesis, da lugar a la formación de marcadores de carbohidratos asociados a tipos tumorales concretos. Estos antígenos se han detectado por métodos químico-inmunológicos <sup>(323)</sup>.

Se ha encontrado acumulación de una gran cantidad de glicolípidos fucosilados y sus derivados sializados en distintos tipos de tumores, principalmente en los que derivan del endodermo, como son los tumores gástricos, de pulmón, y mama <sup>(203,324)</sup>. La presencia de

estos antígenos podría deberse a la activación de fucosil o sialosil-transferasas o también podrían considerarse como resultado de neosíntesis.

La expresión de estos antígenos de superficie celular no sólo está controlada por el balance entre la síntesis y la degradación, si no que también está influenciada por su organización en la superficie celular <sup>\*(325)</sup>.

Muchos determinantes antigénicos asociados a tumores y pertenecientes a la lactoserie pueden ser compartidos por glicolípidos y glicoproteínas. Se ha demostrado que estos determinantes, como el hapteno X, hapteno Y, sialosil Lewis a y sialosil Lewis b, se encuentran a mayor concentración en varios tumores, y se han podido definir por anticuerpos específicos <sup>\*(326,327)</sup>. Estos mismos determinantes se han encontrado en la región periférica de las cadenas de las glicoproteínas <sup>\*(328,329)</sup>, y así, la estructura del hapteno X fue identificada químicamente en las glicoproteínas del neuroblastoma <sup>\*(330)</sup> y en los antígenos carcinoembrionarios <sup>\*(328)</sup>.

Sin embargo, las estructuras antigénicas pertenecientes a globo y ganglioseries se expresan fundamentalmente en los glicolípidos, y entre ellos cabe destacar el GD3 encontrado en melanoma, el Gb3 en linfoma de Burkitt o el Gg3 en el linfoma Hodgkin <sup>\*(331-333)</sup>.

Por otra parte, hay que resaltar que algunos antígenos, especialmente los determinantes fucosilados no sólo están presentes en los tejidos tumorales, si no que también se encuentran en la sangre circulante, pudiéndose determinar su concentración y utilizar este dato en el diagnóstico del cáncer en humanos <sup>\*(334)</sup>. En el plasma, los glicolípidos están habitualmente asociados a lipoproteínas <sup>\*(335)</sup> y se ha podido demostrar que el nivel de gangliósidos está

elevado en animales en los que se han inducido tumores y en pacientes con determinadas neoplasias <sup>\*(336,337)</sup>.

También existe evidencia experimental de que los gangliósidos pueden modular la respuesta fisiológica de los linfocitos, como ya predijeron Esselman y Miller <sup>\*(338)</sup>. Algunos autores han ampliado esta idea para postular que un nivel elevado de gangliósidos, particularmente los polisializados, podrían contribuir al estado inmunosuprimido de los animales en los que se han inducido tumores así como en los pacientes con cáncer <sup>\*(339,340)</sup>, y de la misma manera, también se ha observado que la actividad de las células natural killer podría ser suprimida por el gangliósido GD3 in vitro <sup>\*(341)</sup>.

Aunque la idea de que los gangliósidos sean el factor supresor en el plasma de animales tumor-inducidos es muy atractiva, los datos se basan todavía en ensayos in vitro, y no está del todo claro que este hecho se pueda aplicar in vivo <sup>\*(342)</sup>.

Puesto que la glicosilación anómala es un hecho constatado, ha habido un gran interés en correlacionar la actividad de las glicosiltransferasas y las hidrolasas con los patrones de estas glicosilaciones aberrantes, pero el mecanismo exacto involucrado en este fenómeno aún no se conoce. Lo que sí se ha podido demostrar es que la síntesis de varios glicolípidos se bloquea por la supresión de la actividad de ciertas glicosiltransferasas en ciertos tumores inducidos por actividad vírica. <sup>\*(343)</sup>

Las bases enzimáticas de la glicosilación anómala en el core de la estructura de las glicoproteínas es de suma importancia, y la enzima que parece ser la principal implicada es una  $\beta$ -GlcNAc transferasa aberrante que convierte la GlcNAc 1 $\rightarrow$ 4 Man. y, de hecho, se ha

descrito una elevada actividad de la enzima que produce la bisección de la  $\beta$ -GlcNAc en las células del linfoma en humanos <sup>\*(83,344)</sup>.

En general, las enzimas involucradas en la neosíntesis de las cadenas de los hidratos de carbono anómalos pueden tener una especificidad de sustrato levemente menor que las enzimas intactas, y estos pequeños cambios en la especificidad de sustrato pueden deberse a modificaciones post-transcripcionales de las enzimas. También es posible que las glicosilaciones modificadas en los glicolípidos y glicoproteínas estén bajo el control, si no bajo la influencia directa, de genes transformados y de esta forma, cada vez es más creíble que la glicosilación anómala pueda ser el resultado de una serie de mecanismos en cascada disparados por activación oncogénica. <sup>\*(83,345)</sup>

El significado biológico de la glicosilación aberrante se puede centrar en 3 puntos:

- \* expresión durante la diferenciación y el desarrollo
- \* regulación del crecimiento celular
- \* cambios en la adhesión celular

Todas las cadenas de hidratos de carbono en las glicoproteínas o en los glicolípidos sufren cambios rápidos y drásticos durante el desarrollo y la diferenciación, y ejemplos bien estudiados de estos fenómenos son la alteración en la estructura ramificada de los lacto-series, identificada como una interconversión del gen I/i en la preimplantación del embrión <sup>\*(346)</sup>, la modificación de las cadenas tipo 2, responsables de la aparición del hapteno X, esencial para

el reconocimiento célula-célula en el estadio de mórula del embrión <sup>\*(347)</sup>; el cambio de la expresión del antígeno Pk, P y de Forssman en las globoseries <sup>\*(348)</sup>; o el intercambio en la estructura del core de unas series a otras de glicolípidos en la embriogénesis temprana <sup>\*(349)</sup>.

La glicosilación anómala en las células cancerígenas, además, puede representar expresión retrogénica en la síntesis de los carbohidratos en ciertos estadios de la embriogénesis y desarrollo fetal, aunque todos los datos que avalan esta idea son bastante limitados tanto por problemas técnicos como por problemas de disponibilidad de tejido suficiente.

Por lo que se refiere a la regulación del crecimiento celular, existen datos que avalan que los glicolípidos puedan regular el ciclo celular, y así por ejemplo, se sabe que bajos niveles de los gangliosidos GM3 y GM1 o su delección, en muchos fibroblastos asociados a transformación maligna, puede estar relacionada con la pérdida de control del crecimiento celular y a una saturación de densidad reducida.

Estudios más recientes de crecimiento celular en medios definidos químicamente, han puesto de manifiesto que la adición de GM3 o GM1 exógenos alteran la afinidad de unión de las células al factor de crecimiento derivado de plaquetas, al factor de crecimiento epidérmico o al factor de crecimiento de fibroblastos. Este fenómeno se acompaña de la inhibición de la fosforilación de un factor de crecimiento tirosin-dependiente del receptor del factor de crecimiento plaquetario y del receptor del factor de crecimiento epidérmico <sup>\*(350)</sup>.

En cuanto al significado biológico de la glicosilación aberrante en la adhesión celular, hay que resaltar que los gangliósidos también están presentes en la matriz celular y pueden actuar regulando la actividad de las proteínas de adhesión a sus receptores <sup>\*(351)</sup>. También se piensa

que muchos gangliósidos, particularmente los de tipo no específico, pueden regular la adhesión celular y que la pérdida de esta adhesividad y el crecimiento celular pueden estar relacionados con la pérdida de alguno de estos gangliósidos y la acumulación de otros asociados a tumores <sup>(352)</sup>.

De lo expuesto anteriormente podemos concluir que la glicosilación anómala en los tumores y su correlación con la expresión oncogénica es uno de los problemas que aún quedan por resolver. En muchas células transformadas se ha podido demostrar un defecto enzimático o un aumento de la actividad enzimática en base a una glicosilación anómala <sup>(345)</sup>; sin embargo, algunas células transformadas muestran cambios químicos claros en sus hidratos de carbono aunque la actividad enzimática que los provoca no se ha podido demostrar <sup>(353)</sup>. Es posible, además, que las estructuras de los carbohidratos no estén sólo controladas por la cantidad y calidad de las glicosiltransferasas, si no que también lo puedan estar por el ensamblaje y la organización de complejos multiglicosiltransferasa en las membranas, de tal manera que ambos fenómenos pudieran ser controlados a nivel post-transcripcional por fosforilación o glicosilación de las enzimas <sup>(354,355)</sup>.

A pesar del conocimiento estructural de la glicosilación anómala en las células tumorales, se sabe muy poco de su significado biológico y cabe preguntarse si estos patrones de glicosilación se correlacionan con el grado de malignidad, con el potencial metastásico o son la causa de un reconocimiento defectuosos o una adhesión celular incorrecta.

El estudio del patrón de distribución de los carbohidratos y el cambio en varias clases de los componentes de membrana es importante al intentar correlacionar el patrón de glicosilación con la función biológica de las células.

Existe una gran cantidad de carbohidratos asociados a tumores que se cree que pueden tener utilidad en el diagnóstico histológico de cánceres in situ. Algunos de ellos pueden ser útiles en el diagnóstico de lesiones premalignas, ya que los cambios de gangliósidos específicos en este tipo de lesiones se conoce suficientemente <sup>(356)</sup>.

Por otra parte, y por lo que se refiere a los antígenos tumorales asociados a glicoproteínas, hay que destacar, que el core de las cadenas de carbohidratos unidos a asparagina cambia en muchas células tumorales <sup>(321,357)</sup>, pero estos cambios no suelen afectar a las propiedades antigénicas de las proteínas. Por el contrario, los cambios en las secuencias periféricas de las cadenas unidas en posición N- a la asparagina, o las unidas en posición O- a la serina o treonina pueden contribuir a los cambios antigénicos en las células tumorales.

Existen antígenos compartidos entre las glicoproteínas y los glicolípidos, y en concreto, los glicolípidos pertenecientes a la lactoserie se han encontrado en la región periférica de las glicoproteínas, tanto con uniones tipo N- como tipo O-. Puesto que los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis pertenecen esencialmente a este grupo de glicolípidos, los principales antígenos compartidos por glicolípidos y glicoproteínas son antígenos de grupo sanguíneo, y en consecuencia, los principales antígenos asociados a tumores y compartidos por glicoproteínas y glicolípidos son aquellos relacionados con la modificación de los antígenos de grupo sanguíneo.

Los antígenos de grupo sanguíneo están presentes tanto en células sanguíneas como en otros tipos de células epiteliales, y puesto que la mayoría de los cánceres humanos derivan de este tipo de células, los cambios en los antígenos de grupo sanguíneo se convierten en un hecho clave en la inmunología tumoral humana.

El cambio más importante y más frecuente en los determinantes de grupo sanguíneo en las neoplasias humanas es la delección de los antígenos A y B <sup>\*(358)</sup>. Este cambio también se puede observar en la displasia premaligna con desorganización de la estructura del precursor <sup>\*(359)</sup>.

La síntesis incompleta de las cadenas tipo 2 de los antígenos de grupo sanguíneo puede provenir de la acumulación del antígeno li, aunque la reactividad de li de la mucosa es dependiente del estado secretor/no secretor del individuo y de la presencia de malignidad <sup>\*(360,361)</sup>, o puede ser el resultado de la acumulación de un precursor de las cadenas tipo 1, no relacionado con li <sup>\*(362)</sup>.

La pérdida de los isoantígenos de grupo sanguíneo se ha demostrado en carcinomas de distintos tipos que incluyen carcinomas gástricos, de células de transición, colon, pulmón y mama <sup>\*(184,185,363-369)</sup>, si bien de este último tipo existen muy pocos estudios sistémicos y el significado clínico sigue siendo poco conocido.

En resumen, las neoplasias se asocian comúnmente a modificaciones de una gran cantidad de determinantes antigénicos de membrana plasmática que reflejan alteraciones en la diferenciación bioquímica. La pérdida de los isoantígenos de grupo sanguíneo es evidente en los carcinomas de distinto origen, y, además, existen datos que sugieren una correlación entre la delección de los isoantígenos ABO/Lewis y el pronóstico.

#### **4.3.- Análisis de los resultados.**

### **4.3.- Análisis de los resultados.**

En este apartado analizaremos de una manera independiente los resultados obtenidos en nuestro estudio y trataremos de establecer su validez comparándolos con los datos aparecidos en la literatura.

#### *4.3.1.- Receptores de hormonas esteroides.-*

La importancia de la determinación de los receptores de hormonas esteroides en el comportamiento de las pacientes con cáncer de mama se ha demostrado ampliamente. Las pacientes con tumores positivos para los receptores de estrógenos y progesterona presentan intervalos libres de enfermedad y supervivencia superiores a aquellas que presentan tumores negativos para estos receptores. Además, el estatus de los receptores hormonales ha demostrado ser de valor predictivo para la respuesta del tumor a terapia endocrina <sup>(370)</sup>, lo que ha llevado a desarrollar métodos seguros y clínicamente adecuados para determinar la presencia de los receptores de hormonas esteroides en material procedente de biopsia o resección quirúrgica.

Aunque las técnicas basadas en la unión a radioligandos han sido los métodos standar para el estudio de los receptores hormonales, la producción de anticuerpos monoclonales anti-receptor de estrógenos y progesterona han permitido el desarrollo de análisis inmunohistoquímicos para determinar el status de los receptores.

Son muchos los estudios que han demostrado una correlación significativa entre las técnicas inmunohistoquímicas y los métodos convencionales de determinación de los receptores de

hormonas esteroideas, particularmente, cuando las primeras se han desarrollado en tejidos congelados <sup>(371,372)</sup>.

La necesidad de determinar la localización de los receptores de una manera segura por medios inmunohistoquímicos, en muestras fijadas y embebidas en parafina, ha aumentado con la reciente evolución en la detección y comportamiento del cáncer de mama. La inmunohistoquímica aplicada a secciones en parafina ofrece un mejor detalle morfológico que la aplicada a secciones en congelación, y además, permite la utilización de material de archivo.

En los últimos años han surgido muchos métodos que utilizan distintos kits comerciales disponibles para los receptores de estrógenos y progesterona <sup>(373,374)</sup>. Todos ellos tienen en común la utilización de pretratamientos enzimáticos para aumentar la sensibilidad de la tinción. Más recientemente, el método de recuperación antigénica por medio de irradiación con microondas, ha demostrado aumentar la inmunorreactividad de distintos antígenos tras la pérdida de ciertos epitopos inducida por la fijación. Los datos publicados hasta la fecha son controvertidos, sin embargo, algunos autores han señalado un incremento superior de la inmunotinción después del pretratamiento en microondas que el encontrado al aplicar a las muestras una digestión enzimática, en una amplia gama de anticuerpos testados <sup>(375,376)</sup>.

La determinación del status de los receptores de estrógenos y progesterona utilizando los anticuerpos monoclonales ER1D5 y 1A6 respectivamente, junto con la técnica de recuperación antigénica por medio de microondas, muestra una concordancia muy significativa con las determinaciones realizadas por medio de EIA, por lo que se puede considerar un método fiable y que además presenta la ventaja de su fácil reproductibilidad en el laboratorio.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio (52% de casos positivos para el receptor de estrógenos y 40% para el receptor de progesterona), aplicando estos dos clones citados, y el método de recuperación de antígenos por medio de microondas, han revelado ser ligeramente inferiores a los encontrados por Kell y colaboradores (60% de casos positivos para el receptor de estrógenos y 49% para el de progesterona)<sup>(377)</sup>, si bien estas diferencias se pueden atribuir a los distintos puntos de corte establecidos para determinar la positividad (5% de células teñidas en el estudio de Kell y 20% en nuestro trabajo), y posiblemente también a los distintos sistemas de detección utilizados y a la solución fijadora utilizada en nuestro estudio. La importancia del punto de corte elegido para establecer la positividad de los casos viene avalada por los estudios bioquímicos que establecen una barrera de alrededor de los 11 fmol/mg. de proteína en el citosol para discriminar entre los casos positivos y negativos y que se corresponde con una media del 20% de células positivas detectadas por métodos inmunohistoquímicos. La correlación entre los estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos parece perderse en esta zona de corte.<sup>(372)</sup>

Por otra parte, y comparando los resultados obtenidos en nuestro trabajo con los obtenidos por distintos autores en material congelado, hemos encontrado una positividad inferior en algunos casos y una concordancia de resultados de prácticamente el 100% en otros. Estas discrepancias también se han observado al comparar los resultados de los distintos autores entre sí y es un hecho constatado en la literatura desde hace tiempo<sup>(378)</sup>.

Por lo que se refiere al patrón de distribución hay que señalar que se caracterizó por ser difuso y heterogéneo, tanto intra como interlobularmente, en la práctica totalidad de los casos, y esta heterogeneidad también se observó en las porciones tumorales. La expresión heterogénea de

los receptores de estrógenos y progesterona tanto en tejido normal como neoplásico, está ampliamente reflejada en la literatura <sup>(76,379)</sup>.

En resumen, los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permiten aceptar la fiabilidad del método elegido para la demostración de los receptores de estrógenos y progesterona en el carcinoma ductal de mama, pero también nos hacen recapacitar sobre la necesidad de un sistema estandarizado para la demostración y determinación de estos marcadores en los distintos laboratorios.

#### *4.3.2.- Marcadores de proliferación celular.-*

El resultado clínico de las pacientes con cáncer de mama es altamente variable ya que no depende exclusivamente del tamaño de la lesión, si no también de su evolución.

La proliferación celular de los tumores es una variable biológica importante y puede ser contemplada como un factor pronóstico adicional <sup>(77)</sup>. Sin embargo, y hasta nuestros días, los métodos utilizados para estimar esta variable han tenido un éxito limitado.

Las técnicas que requieren marcaje con timidina tritiada o su análogo no reactivo, la bromodeoxiuridina, o los métodos que requieren la ruptura de la arquitectura tisular o celular para la medida del contenido de DNA por citometría de flujo son complejos, lentos y no se pueden aplicar realmente a las muestras de rutina <sup>(380,381)</sup>.

La aparición de anticuerpos que permiten medir la fracción de crecimiento de una población celular dada mediante técnicas inmunohistoquímicas ha sido de gran utilidad, y en concreto, la

caracterización del anticuerpo monoclonal Ki-67 ha sido clave para determinar el índice de proliferación de una manera rápida y sencilla. Desde que en 1983 se caracterizara este anticuerpo hasta nuestros días, han aparecido más de 600 publicaciones que hacen referencia a este marcador y a su aplicación en la determinación del crecimiento celular en las muestras clínicas y, en particular, en la valoración de la fracción de crecimiento en las neoplasias humanas. Aunque existe alguna discrepancia en la literatura en cuanto a la posible sobreestimación del índice de proliferación por Ki-67, existen numerosos estudios independientes que indican que el índice de marcaje con Ki-67, es un marcador inmunohistoquímico de relevancia pronóstica en el estudio de los tumores humanos <sup>(295,382)</sup>.

El principal inconveniente para el uso rutinario de este anticuerpo ha sido su aplicación exclusiva en tejido congelado, puesto que el epitopo que reconoce se destruye con la fijación. Este problema fue solucionado en 1991, con la producción del anticuerpo monoclonal MIB-1, a partir de partes recombinantes de Ki-67 <sup>(129)</sup>.

La especificidad de este nuevo anticuerpo para el antígeno Ki-67 ha sido confirmada por inmunotinción de secciones congeladas y por Western blotting. Inicialmente, los resultados de las tinciones de rutina de las muestras incluidas en parafina con este anticuerpo fueron controvertidas, sin embargo, cuando se aplicó a las secciones el método de recuperación antigénica por medio de calentamiento en microondas con buffer citrato, propuesto por Shi y colaboradores se obtuvieron resultados comparables a los que ofrecía el anticuerpo originario en secciones congeladas <sup>(151)</sup>.

Los patrones de tinción nuclear obtenidos con MIB-1 en secciones incluidas en parafina coinciden con los obtenidos con Ki-67 en congelación y con los de incorporación de precursores de DNA marcados en células normales en proliferación.

La cuantificación de la positividad de Ki-67 en tumores es divergente, y la medida de células positivas varía del 7.2% al 22%. En parte, estas diferencias se pueden explicar por los distintos métodos de evaluación elegidos, aunque más que el método, es la selección del punto de corte lo que parece tener mayor importancia en cuanto al pronóstico, considerándose significativos los marcajes del 20% de las células o superiores <sup>(214)</sup>.

En nuestro estudio hemos aceptado este punto de corte para establecer la positividad del marcaje, y de los 88 casos analizados el 28% superaba el punto de corte, el 66% expresaba menos del 20% de las células marcadas y un 6% de los casos fueron negativos.

La negatividad para el marcador es un hecho observado por autores como Walker y Camplejohn, quienes han descrito hasta un 44% de casos negativos para este marcador en una serie de 95 carcinomas. <sup>(383)</sup>

Por otra parte, nuestros datos son plenamente concordantes ( $p < 0.001$ ) con la literatura en lo que se refiere a la relación de este marcador con variables histológicas como el grado histológico, nuclear, tamaño del tumor y metástasis, <sup>(317,318)</sup> encontrando que la expresión de Ki-67 es superior en los casos que presentan mayor grado histológico y nuclear, un mayor número de ganglios afectados y mayor tamaño de la masa tumoral.

Por lo que respecta al patrón de distribución, hemos encontrado en todos los casos positividad exclusivamente nuclear, observando el hecho constatado por Brown <sup>(382)</sup> de la diferente distribución topográfica del antígeno dentro del núcleo.

En cuanto al antígeno nuclear de proliferación celular PCNA, existen distintos estudios que han demostrado correlación entre la medida de la inmunorreactividad de este marcador y otras variables pronósticas en una amplia gama de neoplasias <sup>(78,79)</sup>.

Muchos de los procedimientos utilizados para estudiar la fracción de crecimiento de una población celular requieren tejidos frescos o congelados, lo cual limita su utilidad en material de archivo incluido en parafina. El anticuerpo monoclonal PC10, reconoce una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta, que es detectable en tejidos fijados e incluidos en parafina.

Los resultados obtenidos con este marcador son muy variables, observándose grandes diferencias en la inmunorreactividad, en función del fijador elegido y del tiempo empleado en la fijación.

A pesar de las discrepancias observadas entre los distintos autores, parece haber una asociación directa entre la expresión de PCNA, el grado histológico del tumor y la aneuploidía, y así, las mujeres con cáncer de mama que presentan un histograma próximo a la diploidía y con más del 20% de las células tumorales positivas para PCNA tienen un curso clínico significativamente peor que aquellas que, con un histograma similar presentan menos del 20% de positividad para el marcador. Sin embargo, la inmunorreactividad de PCNA no parece aportar ninguna información pronóstica adicional en pacientes con tumores altamente aneuploides <sup>(215)</sup>.

En cuanto a la relación del PCNA con otros parámetros histológicos y de interés pronóstico, los datos son todavía más controvertidos, y, mientras que autores como Robbins, Hall o Kamel sostienen que el PCNA es útil para la detección de la proliferación celular en tejidos normales y neoplásicos y, que, además, tiene valor pronóstico en ciertas poblaciones tumorales, otros grupos, como el de Figge o el de Thomas, mantienen que este marcador tiene un pobre valor pronóstico <sup>(175,311,384-386)</sup>.

En nuestro estudio hemos encontrado una asociación muy significativa ( $p < 0.001$ ) entre el PCNA/PC10 y los marcadores histológicos utilizados en este trabajo, y, además, la media de células positivas (22%) es ligeramente superior a la encontrada en la literatura, hecho atribuible al fijador utilizado <sup>(387)</sup>. El marcaje en todos los casos fue nuclear, observándose en algunos de ellos una leve difusión citoplásmica, que puede atribuirse al método utilizado para detectar este factor de proliferación, o puede representar síntesis citoplásmica o breakdown como propone Hall <sup>(175)</sup>.

#### 4.3.3.-Isoantígenos de grupo sanguíneo.-

Los antígenos de grupo sanguíneo son hidratos de carbono unidos a glicoproteínas y glicolípidos en la membrana de la superficie celular.

Estos antígenos están ampliamente distribuidos por el organismo, encontrándose no sólo en los eritrocitos, si no también en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y en varios tipos de células epiteliales y sus secrecciones.

Aunque las características funcionales de estos antígenos no se conocen plenamente, se han observado alteraciones en su expresión durante el desarrollo y la diferenciación en las células humanas, y, actualmente se admite, que juegan un papel importante como señales o receptores en el contacto célula-célula o célula- matriz intercelular <sup>\*(388)</sup>.

En los últimos años se ha demostrado que las células neoplásicas muestran 3 cambios fundamentales en la expresión de estos antígenos con respecto a las células normales de las que proceden; estos cambios son 1.-delección de los antígenos, 2.-acumulación de sustancias precursoras y 3.- expresión de antígenos incompatibles con el fenotipo eritrocitario.

Por otra parte, la regulación génica anómala de estos antígenos puede dar lugar a bloqueo o variación en la síntesis y en la organización de las moléculas de la superficie celular que median la interacción celular, el desarrollo y la diferenciación. <sup>\*(345,389,390)</sup>

La expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo se ha estudiado en células normales, premalignas y malignas de distintos órganos mediante técnicas inmunohistoquímicas y utilizando anticuerpos monoclonales <sup>\*(391)</sup>. La pérdida de expresión de estos marcadores ha sido ampliamente constatada en la literatura en distintos tipos de tumores que incluyen carcinomas de colon, urotelio, pulmón, estómago etc. <sup>\*(184,185,363-369)</sup>.

En cuanto a los tumores de mama, existen muy pocos estudios que hagan referencia a este fenómeno, y, el significado clínico sigue siendo una incógnita.

Las pocas publicaciones referentes a la pérdida de expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo en el cáncer de mama, coinciden en el hecho de describir una pérdida total o parcial

de los mismos en un porcentaje variable de casos, asumiéndose en la actualidad, que la pérdida de expresión no es un fenómeno universal en todos los carcinomas invasivos. Por lo que se refiere a la utilidad pronóstica de estos marcadores, hay que resaltar que los datos existentes en la literatura son controvertidos, y, mientras que algunos autores sostienen que la pérdida de expresión de los isoantígenos ABH y fundamentalmente Lewis, está asociada al pronóstico, otros mantienen que el estatus de los isoantígenos no presenta relación significativa con distintos parámetros clínicos y patológicos, y que además, no tienen utilidad como determinantes pronósticos <sup>\*(367,392,393)</sup>,

Por lo que se refiere a la relación de la pérdida de expresión de los antígenos de grupo sanguíneo con otros marcadores de interés pronóstico en el cáncer de mama, son menos aún los trabajos publicados. Ura y sus colaboradores <sup>\*(100)</sup> en un trabajo publicado en 1992, y estudiando 31 muestras de cáncer de mama y tejido normal adyacente mediante dot blot, encontraron que en el 83,9% de los casos había correspondencia entre el tejido normal y el canceroso respecto a la expresión de los isoantígenos ABH. Para el resto de las muestras encontraron cambios antigénicos significativos que incluían pérdida de los determinantes de grupo A y B, expresión de grupo A en las células tumorales de pacientes de grupo B, y expresión de los determinantes antigénicos A y B en pacientes del grupo O.

Otro de los hallazgos descritos en este trabajo es una disminución generalizada de los niveles de los antígenos A y B en las células tumorales cuando se comparaban con las células del tejido mamario normal adyacente.

En cuanto a los antígenos Lewis, el autor también encuentra una disminución de los niveles de los antígenos Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup> y Le<sup>y</sup> en las células tumorales y un aumento de la expresión de Le<sup>x</sup>. En

el mismo artículo el autor estudia la relación entre los niveles de Le<sup>x</sup> y el receptor de estrógenos y progesterona obteniendo una relación inversa entre los niveles del antígeno Le<sup>x</sup> en el tejido tumoral/normal y el contenido de RE y Rpg en los tumores.

Por otra parte, Narita y su grupo <sup>(393)</sup> han estudiado la expresión de los isoantígenos Lewis en 300 carcinomas ductales de mama mediante métodos inmunohistoquímicos. Este autor ha utilizado un sistema de tabulación que nosotros hemos adoptado para nuestro estudio, y así la expresión se ha definido como positiva o negativa en la porción no cancerosa de la muestra y para la porción tumoral el autor asigna una triple escala: expresión negativa, expresión positiva en menos del 50% de las células y expresión en más del 50% de las células. En el mismo trabajo se analiza la relación entre la expresión de los isoantígenos Lewis y otros factores clinicopatológicos como el tamaño del tumor, metástasis ganglionar, estadio, tipo histológico y el estatus del receptor de estrógenos.

Los datos obtenidos por este grupo revelan una pérdida total de Le<sup>a</sup> en el 89% de los tejidos cancerosos y una expresión en menos del 50% de las células en un 10%, mientras que sólo el 1% del tejido tumoral expresaba este isoantígeno en más del 50% de las células tumorales; en la porción no cancerosa la expresión del isoantígeno fue negativa en el 82% de los casos y el 18% restante lo expresaba en menos del 50% de las células.

Los resultados obtenidos para Le<sup>b</sup> y Le<sup>x</sup> fueron muy similares, encontrando que la expresión fue negativa en la porción tumoral en un 77 y 65% respectivamente, positiva en menos del 50% de las células en el 25 y 24% y positiva en más del 50% de las células en el 9 y 11%. Por lo que se refiere a la porción no tumoral estudiada los datos arrojaron valores muy diferentes y así el isoantígeno Le<sup>b</sup> no se expresó en el 35% de los casos y se expresó en el 65% en menos

del 50% de las células, el Le<sup>x</sup> no se expresó en el 59% de los casos y en el 41% lo hizo en menos del 50% de las células. El isoantígeno Le<sup>y</sup> por su parte, no se expresó en la región tumoral en el 33% de los casos, en el 30% lo hizo en menos del 50% de las células y en 37% lo hizo en más del 50%; por otra parte, no se obtuvo expresión de este isoantígeno en la porción no tumoral en el 24% de los casos y el 76% restante lo expresó en menos del 50%.

Este grupo asume en su trabajo que la síntesis de los antígenos tipo 2 se ve incrementada y los antígenos de tipo 1 disminuyen su expresión en asociación con la carcinogénesis en el cáncer de mama al igual que sucede con el de pulmón y ovario, y que la expresión relativa de los antígenos tipo 2 en el tejido tumoral de los cánceres de mama parecen ser capaces de ser útiles como indicadores de malignidad y como factores pronósticos.

Por lo que atañe a los isoantígenos ABH, Lee y sus colaboradores <sup>\*(392)</sup> en un estudio de 233 pacientes con cáncer de mama, encontraron que la pérdida de expresión de los isoantígenos ABH no era universal en todos los carcinomas pero el 64, 77 y 73% de los carcinomas de grupo A, B y AB respectivamente mostraban una pérdida total de expresión de los isoantígenos.

Este grupo de trabajo, por su parte, no asume la utilidad de los isoantígenos ABH como determinantes de utilidad pronóstica, y en el trabajo no se hace referencia a ningún tipo de estudio adicional para correlacionar la pérdida de expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo con ningún otro parámetro de valor pronóstico.

En nuestro estudio hemos analizado la expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo en 82 carcinomas ductales infiltrantes de mama y su relación con marcadores histológicos y de interés pronóstico en este tipo de tumores.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo revelan unos datos ligeramente superiores para la pérdida de expresión de grupo A (68%) y ligeramente inferiores para la pérdida de grupo B y AB (57 y 71,5% respectivamente) en la porción tumoral a los encontrados por Lee en un estudio similar.<sup>\*(392)</sup>

Por lo que se refiere a la pérdida de expresión del grupo AB hay que resaltar que el 28,5% de los casos perdió la expresión para el antígeno de grupo A exclusivamente y no obtuvimos ningún caso que conservara la expresión para A y perdiera la expresión del antígeno B.

En ninguno de los casos de grupo O observamos cambio fenotípico de grupo.

Las variaciones de los resultados obtenidos en nuestro estudio se pueden explicar por los diferentes anticuerpos utilizados, ya que este fenómeno también ha sido observado por los autores anteriormente citados <sup>\*(392)</sup>.

Por lo que se refiere al patrón de expresión, hay que destacar la heterogeneidad de la distribución observada en todos los casos. Como comentamos en un apartado anterior, el patrón de distribución y la regulación de los isoantígenos de grupo sanguíneo es un proceso muy complejo y muy diferente de unos tejidos a otros. Además de las diferencias en los distintos tejidos y tipos celulares, la heterogeneidad de la distribución se ha constatado incluso en células morfológicamente indistinguibles del mismo tejido. En algunos casos, este tipo de

heterogeneidad se puede relacionar con la maduración, la diferenciación y con la transformación maligna de las células <sup>\*(394)</sup>. Este patrón de distribución en mosaico, también se ha tratado de explicar, asumiendo que los genes que controlan las enzimas necesarias para la adición de los determinantes antigénicos no son funcionales o no se encuentran en algunas células <sup>\*(395)</sup>. Las diferencias en los patrones de glicosilación entre las distintas poblaciones celulares puede también reflejar diferentes estadios de diferenciación y progresión en las células tumorales, ya que parece existir una correlación entre la heterogeneidad de la distribución y el grado de diferenciación <sup>\*(396)</sup>.

En el epitelio glandular normal, también se observó un patrón de distribución microheterogéneo tanto a nivel del Golgi como de la membrana plasmática, además también pudimos observar que algunos casos que mostraban positividad en los eritrocitos y células endoteliales eran negativos para la tinción en los ductos normales o mostraban una tinción débil. Este hecho también ha sido constatado por Lee y su equipo que encontraron un 12% de casos positivos para hematies y vasos y negativos o débilmente positivos en el epitelio mamario no neoplásico <sup>\*(392)</sup>.

La asociación altamente significativa encontrada ( $p < 0.001$ ) entre la pérdida de expresión de los isoantígenos ABO y los marcadores de pobre pronóstico sugieren la utilidad de los primeros en el pronóstico del carcinoma ductal infiltrante de mama en humanos.

En cuanto a la expresión de los isoantígenos Lewis hemos hallado una pérdida de expresión muy inferior a la encontrada en la literatura <sup>\*(367,393)</sup>. En nuestro estudio hemos observado una pérdida total de expresión para Le<sup>a</sup> en la porción tumoral del 34, 89 y 58% de los casos con control interno positivo, negativo y en los que no obtuvimos control interno respectivamente. Si

no tenemos en cuenta la expresión en el control interno, la pérdida de expresión de Le<sup>a</sup> corresponde al 47% de los casos. Narita <sup>\*(393)</sup> en su estudio obtiene un 89,3% de casos negativos e Idiko <sup>\*(367)</sup> un 100%. En ninguno de los estudios se refleja la positividad o negatividad del control interno.

En nuestro trabajo también hemos encontrado que la expresión en menos del 50% de las células tumorales es del 62, 11 y 31% para los casos con control interno positivo, negativo y sin control interno respectivamente. Si no tenemos en cuenta el control interno el número de casos que expresan Le<sup>a</sup> en menos del 50% de las células tumorales representa el 47% frente al 10% aproximadamente que encuentra Narita <sup>\*(393)</sup>. Idiko no contempla este resultado en su trabajo.

Finalmente en nuestro estudio hemos encontrado que la expresión de este isoantígeno en más del 50% de las células tumorales es del 4 y 11,5% para los casos con control interno positivo y los casos en los que no obtuvimos control interno respectivamente. No había ningún caso con el control interno negativo y esta expresión para Le<sup>a</sup> en el tumor. Globalmente, y sin tener en cuenta el control interno, estos datos corresponden al 6% de los casos estudiados, valor muy superior al encontrado por Narita <sup>\*(393)</sup> (1%) en su estudio.

El estudio del isoantígeno Le<sup>b</sup>, por su parte, revela unos resultados similares y así, en nuestro trabajo el número de casos que presenta una pérdida total del isoantígeno Le<sup>b</sup> representa el 33% frente al 66% encontrado por Narita <sup>\*(393)</sup> y el 80% encontrado por Idiko <sup>\*(367)</sup>. El número de casos que, en nuestro estudio, expresa Le<sup>b</sup> en menos del 50% de las células tumorales representa el 60% del total frente al 25% aproximadamente que encuentra Narita <sup>\*(393)</sup>. Por

último en nuestro estudio el 7% de los casos expresa Le<sup>b</sup> en más del 50% de las células tumorales frente al 9% encontrado por Narita <sup>(393)</sup> en su trabajo.

Por lo que respecta al estudio del isoantígeno Le<sup>x</sup>, en nuestro trabajo hemos encontrado una pérdida total de expresión del isoantígeno en el 37% de los casos frente al 65% encontrado por Narita <sup>(393)</sup>.

El número de casos que en nuestro estudio expresa Le<sup>x</sup> en menos del 50% de las células tumorales asciende al 51% frente al 24% encontrado por el autor anteriormente citado. Por último el 12% de los casos estudiados en nuestro trabajo expresaron Le<sup>x</sup> en más del 50% de las células tumorales frente al 10% encontrado por Narita <sup>(393)</sup>.

En cuanto al estudio del isoantígeno Le<sup>y</sup>, nuestros datos revelan una pérdida total de expresión en las células tumorales en tan sólo el 4% de los casos. Narita y sus colaboradores encuentran en su estudio <sup>(393)</sup> un 33% de casos. La pérdida parcial de expresión de Le<sup>y</sup> alcanza al 34% de los casos analizados en nuestro estudio frente al 30% del autor antes citado.

Nuestros datos también revelan que el 62% de nuestros casos expresan el isoantígeno en más del 50% de las células tumorales, mientras que el mismo autor anteriormente citado obtiene unos resultados del 38%.

Esta diferencia de resultados la podríamos atribuir, presumiblemente también, a los distintos anticuerpos utilizados, a la elección del fijador y posiblemente, al tiempo de almacenamiento del material.

El patrón de distribución observado para la expresión de los isoantígenos Lewis, tanto en el tejido tumoral como en el epitelio glandular normal, corresponde a una expresión en mosaico, microheterogénea tanto a nivel del Golgi como de la membrana citoplásmica.

Al igual que en el caso anterior, la asociación altamente significativa encontrada ( $p < 0.001$ ) entre la pérdida de expresión de estos marcadores y el resto de los parámetros utilizados en nuestro trabajo, nos permiten proponer que los isoantígenos Lewis pueden tener valor pronóstico en los tumores de glándula mamaria.

Las variaciones en los resultados nos hacen reflexionar, de la misma manera que en la valoración de los receptores de hormonas esteroideas y marcadores de proliferación, en una unificación de criterios en cuanto al tipo de anticuerpos y sistemas de tabulación y detección utilizados en este tipo de estudios para que los datos obtenidos en los distintos laboratorios sean completamente equiparables y puedan servir de referencia para estudios posteriores.

---

## **V. Resumen y Conclusiones**

## **V.-RESUMEN Y CONCLUSIONES**

### **5.1.RESUMEN:**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres de los países industrializados. La etiología de la enfermedad se asocia fundamentalmente a factores genéticos, hormonales y ambientales. Aunque los programas de educación pública y el screening mamográfico han logrado que el diagnóstico sea actualmente precoz, y hayan aumentado los casos de pacientes diagnosticadas que no presentan afectación ganglionar y con tumores relativamente pequeños, no se ha conseguido disminuir la tasa de mortalidad, y por este motivo este tipo de neoplasias continúa siendo un desafío para la Medicina.

Puesto que la evolución de las pacientes con cáncer de mama es en gran medida imprevisible, y dada la extraordinaria variabilidad que presentan en el curso clínico, ha habido un notable interés en identificar las características importantes que permiten predecir el "comportamiento" del tumor, interés acuciado por el advenimiento reciente de estrategias prometedoras de tratamientos coadyuvantes.

Junto con los parámetros histoanatomopatológicos convencionales (tamaño del tumor, afectación ganglionar, grado histológico, grado nuclear, mitosis), que continúan siendo la base del diagnóstico, conviven en la actualidad marcadores biológicos, algunos sumamente útiles, (como los receptores de hormonas esteroideas) en lo que se refiere al pronóstico y a la posibilidad de tratamientos adyuvantes, y otros que se perfilan como

promesas, pero que en cualquier caso están contribuyendo al conocimiento de la biología tumoral y están aumentando las expectativas de las mujeres que padecen esta enfermedad.

Dentro de este último grupo se encuadran los antígenos histosanguíneos, objeto de nuestro estudio, y los fenómenos de glicosilación anómala.

Las neoplasias se asocian frecuentemente con modificaciones de una gran variedad de determinantes antigénicos de las membranas plasmáticas que reflejan alteraciones en la diferenciación bioquímica. Los antígenos de grupo sanguíneo ABO y los antígenos Lewis son glicolípidos de membrana de muchas células epiteliales, y su pérdida se ha descrito en carcinomas de distinto origen. En algunos casos, además, existe una clara evidencia que sugiere la correlación entre la delección de estos isoantígenos y el pronóstico.

En este trabajo hemos estudiado la expresión anómala de los antígenos de grupo histosanguíneo ABO y Lewis en 88 carcinomas ductales de mama, y su relación con parámetros histoanatomopatológicos y marcadores de probado interés pronóstico en este tipo de tumores.

Los datos obtenidos confirman la pérdida de expresión de estos isoantígenos en las neoplasias mamarias, si bien los resultados aportados en nuestro estudio son ligeramente inferiores a los encontrados en la literatura.

En cuanto a los resultados obtenidos para la expresión de los receptores de hormonas esteroides en nuestra serie, los datos revelan una expresión menor para el receptor de estrógenos y progesterona con respecto a estudios realizados por otros grupos; estas

diferencias son atribuibles por completo al método elegido para la determinación de estos marcadores y, fundamentalmente, al criterio seguido para establecer el punto de corte representativo de positividad.

Por lo que respecta a los marcadores de proliferación celular, los resultados son equiparables a los encontrados en la literatura, con un ligero aumento de la media de células positivas para el marcador PCNA atribuible a la mezcla fijadora utilizada y al tiempo de fijación establecido.

Los resultados obtenidos al relacionar estos dos tipos de marcadores con las variables histológicas convencionales (grado histológico, grado nuclear, tamaño del tumor y afectación de ganglios), nos permiten aceptar con un alto nivel de significación ( $p < 0.001$ ) la validez de nuestras técnicas.

Por otra parte, el test de asociación realizado para la pérdida de expresión de los isoantígenos de grupo sanguíneo en relación con las demás variables analizadas en este trabajo, nos ha permitido aceptar la asociación altamente significativa ( $p < 0.001$ ) existente entre ellos.

## 5.2. CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo y los datos aportados por el estudio estadístico realizado nos permiten concluir que:

1. La pérdida de expresión de los isoantígenos de grupos sanguíneo ABO y Lewis no es un fenómeno universal en el carcinoma ductal de mama.
2. La expresión anómala de los histogrupos sanguíneos ABO se asocia muy significativamente ( $p < 0.001$ ) con un mayor grado histológico, nuclear, afectación de ganglios axilares y tamaño tumoral.
3. La pérdida parcial o total de la expresión de los antígenos de grupo sanguíneo ABO se asocia muy significativamente ( $p < 0.001$ ) a una menor expresión del receptor de estrógenos y progesterona.
4. La expresión aberrante de los isoantígenos sanguíneos ABO se asocia muy significativamente ( $p < 0.001$ ) a una mayor expresión de los marcadores de proliferación Ki67 (MIB-1) y PCNA (PC10).
5. La expresión anómala de los isoantígenos Lewis<sup>a,b,x,y</sup> se asocia muy significativamente ( $p < 0.001$ ) con los parámetros histopatológicos de pobre pronóstico (elevado grado nuclear, histológico, tamaño del tumor y afectación de ganglios no loco-regionales).

6. La no expresión o la expresión parcial de los isoantígenos Lewis se asocia muy significativamente ( $p < 0.001$ ) a una menor expresión de los receptores de hormonas esteroides.
  
7. La expresión anómala de los antígenos Lewis se asocia muy significativamente ( $p < 0.001$ ) a una mayor expresión de los marcadores de proliferación Ki67 (MIB1) y PCNA (PC10).

Por consiguiente, y resumiendo los puntos anteriores, este trabajo demuestra que la glicosilación anómala en el carcinoma ductal de mama es un fenómeno asociado a la malignidad y pobre pronóstico y que su determinación es de utilidad en este tipo de neoplasias.

---

## **VI. Bibliografía**

## **VI.-BIBLIOGRAFIA**

- \*1.- *Segundo Libro Blanco de Oncología en España. Ed. de caracter no venal. Impreso en Fernández Ciudad S.L. 1995.*
- \*2.- *Simow A. Smith and Bruce AJ Ponder. Predisposing genes in breast and ovarian cancer: an overview. NIH; May:291-296)*
- \*3.- *Anderson DE. Some characteristics of familial breast cancer. Cancer 28: 1500-1504; 1971*
- \*4.- *Ottman R. Pike MC, King MC, Henderson BE. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. Lancet II: 556-558; 1983*
- \*5.- *Newman B. Austin MA. Lee M. King MC. Inheritance of human breast cancer. Evidence by autosomal dominant transmission in high -risk families. Proc Natl Acad Sci USA 85:3044-3048; 1988*
- \*6.- *Easton DF. Bishop DT. Ford D. Cockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. Am J Hum Genet 52:678-701; 1993*
- \*7.- *Wolman SR. Pauley RJ. Mohamed AN. Dawson PJ. Visscher DW. Sarkar FH. Genetic markers as prognostic indicators in breast cancer. Cancer 70: 1765-1774; 1992*
- \*8.- *Aver GU. Caspersson TO. Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. Anal Quant Cytol Histol 2:161-165; 1980*
- \*9.- *Fallenius AG. Aver GU. Carstensen JM. Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. Cancer 62: 331-441; 1988*
- \*10.- *Koss LG. Czerniak B. Herz F. Werst RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. Hum Pathol 20:528-548; 1989*
- \*11.- *Crissman JD. Visscher DW. Kubus MS. image cytophotometric DNA analysis of atypical hyperplasias and intraductal carcinomas of the breast. Arch Pathol Lab Med 114: 1249-1253; 1990*
- \*12.- *Carpenter R. Gibbs N. Matthews J. Cooke T. Importance of cellular DNA content in premalignant breast disease and pre-invasive carcinoma of the female breast. Br J Surg 74: 905-906; 1987*
- \*13.- *Christov K. Milev A. Todorov V. DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors. Cancer 64:673-679; 1989*
- \*14.- *Dressler LG. Seamer LC. Owens MA. Clark GM. McGuire WL. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. Cancer 61:420-427; 1988*

- \*15.- Clark GM. Dressler LG. Owens MA. Pounds G. Oldaker T. McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 320:627-633; 1989
- \*16.-Mitelman F. *Catalog of chromosomal aberrations in cancer. 3rd ed. New York: Salan R. Liss; 1988*
- \*17.-Brito-Babapule V. Atkin NB. Breakpoints in chromosome 1 abnormalities of 218 human neoplasm. *Cancer Genet Cytogenet* 4:215-225; 1981
- \*18.- Gebhart E. Bruderlein S. Augustus M. Siebert E. Feldner J. Schmidt W. Cytogenetic studies on human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 8: 125-138; 1986
- \*19.-Alitalo K. Schwab M. oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res* 47: 235-277; 1986
- \*20.-Escot C. Theillet C. Lideran R. et al. Genetic alterations of c-myc protooncogene in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4834-4838; 1986
- \*21.-Lideran R. Callahan R. Dickson C et al. Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Res* 2: 285-289; 1988
- \*22.-Ali IU. Merlo G. Lideran R. Calahan R. The amplification unit on chromosome 11q13 in aggressive primary human breast tumors contains the bcl-1, int-2 and hst loci. *Oncogene* 4: 89-92; 1989
- \*23.-Ali IU. Campbell G. lideran R. Callahan R. Lack of evidence for the prognostic significance of c-erb B2 amplification in human breast carcinoma. *Oncogene Res* 3: 139-146; 1988
- \*24.-Schechter AL. Stem DF. Valdyanathan L et al. The Neu oncogene. An erb-B related gene encoding a 185,000M tumor anti-gen. *Nature* 312:513-516; 1984
- \*25.-Callahan R. Genetic alterations in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 13:191-203; 1989
- \*26.-Mariani-Constantini R. Escot C. Theillet C. et al. In situ myc expression and genomic status of the c-myc locus in infiltrating ductal carcinomas of the breast. *Cancer Res* 48:199-205; 1988
- \*27.-Levine AJ. Tumor supressor genes. *Bioassays* 12: 60-66; 1990
- \*28.- Seemayer TA. Cavenee WE. *Biology of disease:Molecular mechanisms of oncogenesis. Lab Invest* 60:585-599; 1989
- \*29.- Hollingsworth RE. Lee W-H. Tumor supressor genes: New prospect for cancer research. *J Natl Cancer Inst* 83: 91-96; 1991
- \*30.-Varley J. armour J. Swallow JE et al. The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumors. *Oncogene* 4: 725-729; 1989
- \*31.-Sato T, Tanigami A, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, and Nakamura Y. Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 50:7184-7189, 1990.)
- \*32.- Morita R. Ishikawa J. Tsutsumi M et al. Allelotype of renal cell carcinomas. *Cancer Res* 51: 820-823; 1991
- \*33.- Vogelstein B. Fearon E. Kern BE. et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244: 207-211, 1989

- \*34.-Callahan R. Cropp CS. Merlo GR. Liscia DS et al. Somatic mutations and human breast cancer. *Cancer* 69: 1582-1588; 1992
- \*35.-McGuire WL. Naylor SL. Loss of heterozygosity in breast cancer: Cause or effect. *J Natl Cancer Inst* 81:1764-1765; 1989
- \*36.-Cropp C. Liderau R. Campbell G. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 17 and 18 in breast carcinoma: Two new regions identified. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7737-7741; 1991
- \*37.-Mackay J. Elder PA. Porteous DJ. et al. Partial deletion of chromosome 11p in breast cancer correlates with size of primary tumor and estrogen receptor level. *Br J Cancer* 58: 710-714; 1988
- \*38.-Devilee P. van den Broek M. Knipers-Dijkshoorn N. et al. At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics* 5: 554-560; 1989
- \*39.-Yokota J. Wada M. Shimosato Y et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 3,13 and 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc natl Acad Sci USA* 84: 9252-9256; 1987
- \*40.-Vogelstein B. Fearon ER. Hamilton SR. et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532; 1988
- \*41.-Lee E. To H. Shew J. et al. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 241: 218-221; 1988
- \*42.-T' Ang A. Varley JM. Chakraborty S et al. Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science* 242: 263-266; 1988
- \*43.-Lee WH. Shew JY. Hong F. et al. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 329:642-645; 1985
- \*44.- Osborne RJ. Merlo GR. Mitsudomi T et al. Mutations in the p53 gene in primary human breast cancer. *Cancer Res* 51: 6194-6198; 1991
- \*45.-Bartek J. Iggo R. Gannon J. Leane DP. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5:893-899; 1990
- \*46.-Cattoretti G. Rilke F. Andreola S. et al. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41: 178-183; 1988
- \*47.- Fields S. Jang SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249: 1046-1049; 1990
- \*48.-Raycroft L. Wu HY. Lozano G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 249: 1049-1051; 1990
- \*49.- Callahan R. and Campbell G. Mutations in human breast cancer: an overview. *J Natl Cancer Inst.* 81:1780-1786; 1989.)
- \*50.-McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: Evaluation guide-lines. *J Natl Cancer Inst* 83: 154-155; 1991
- \*51.-Jensen EV. Hormone dependency e receptor in the treatment of breast cancer. *Eur J Cancer* 13:1205-1215;1977

- \*52.- Beaston GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestion for a new model of treatment with illustrative cases. *Lancet* 2:104-107; 1896)
- \*53.- Dickson RB, and Lippman ME. Molecular determinants of growth, angiogenesis and metastases in breast cancer. *Sem Oncol* 19:286; 1992.
- \*54.- Anderson JN. The effect of steroid hormones on gene transcription. *Biol Regul Dev* 3B:169-212; 1984).
- \*55.- Fisher B, Constantino J, Renon C, et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen receptor-positive tumors. *N. Engl. J. Med.* 320:479-484; 1989.
- \*56.- Allegra JC, Lippman MG, Thompson GB, Simon R, Barlock A, Green L et al. Estrogen receptor status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 16: 323-331; 1988
- \*57.- Leclercq; G, Henson JC. Therapeutic significance of sex steroid hormone receptor in the treatment of breast cancer. *Eur J Cancer* 13:1205-1215; 1977
- \*58.- Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powel J. Eds. *Cancer incidence in Five Continents. Vol VI IARC. Scientific. Publ N°120 Lyon:IARC, 1992).*
- \*59.- Willet W, et al. Dietary fat and fiber in relation to the risk of breast cancer. An eight-year study. *J.A.M.A.* 268:2037; 1992.
- \*60.- Bittner JJ. Some possible effects of nursing on mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84:162; 1936.
- \*61.- Black MM, Zachrau RE, Shore B. Leukocyte migration test vs gp55 of RIII-MuMTV. In: *Compendium of Assays for immunodiagnosis of human cancer development in Cancer Research*, edited by RB Herberman, Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York, 1979, pp 423-430).
- \*62.- McCoy JL, Ames R, Braatz J et al. Cellular immunity to mouse mammary tumor virus (MMTV) in breast cancer patients (meeting abstract). *Abstract of the 5th Meeting of the European Association for Cancer Research, Viena 1979*, p 49).
- \*63.- Wanebo HJ, Fukuda M, Tsuei L, et al. Leukocyte migration inhibition response to certain breast cancer-related antigens (MCF-7 and MuMTV): Their potencial as discriminants. *Surgery* 86:275-283, 1979
- \*64.- Fukuda M, Wanebo HJ, Tsuei L et al. Leukocyte migration inhibition among breast cancer patients in response to various oncogenic viruses. *JNCI* 64:431-437; 1980
- \*65.- Rodriguez Garcia F, Machado F, Reynal F. Avances en el tratamiento del cáncer de mama. *Gin Obs (II)*: 3675-3683; 1992
- \*66.- Haybittle JL, Brinkley D, Houghton J, A'Hern RP, Baum M. Postoperative radiotherapy and late mortality: evidence from the Cancer Research Campaign trial for early breast cancer. *Br Med J* 298: 1611-1614, 1989)
- \*67.- Love RR. Tamoxifen therapy in primary breast cancer biology, efficacy, efficacy and side effects. *J Clin Oncol* 7: 803; 1989
- \*68.- Fisher B, Remond C, Fisher E. Systematic adjuvant therapy in treatment of primary operable breast cancer. *Cancer* 1: 35; 1986

- \*69.- Dombernowsky P, Brinker H, Hansen M. Adjuvant chemotherapy of premenopausal and menopausal high risk breast cancer patients. Present status of the DBCGG 77-B and 82 B. *Acta Oncol* 27:691; 1988.
- \*70.- Buzdar, Hortobagyi GN, Smith TL. Adjuvant therapy of breast cancer with additional treatment with alternated drug. *Cancer* 62: 2098; 1988).
- \*71.- Clark GM, McGuire WL. New biologic prognostic factors in breast cancer. *Oncology* 3:49-54; 1989.
- \*72.- Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor and patient characteristic in human breast cancer. *J Clin Oncol.* 2:1102; 1984.
- \*73.- Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, et al. Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 309:1343; 1983.
- \*74.- Fisher B, Redmon C, Fisher ER, et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients: Findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol.* 6:1076; 1988.
- \*75.- Legha SS. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *Ann Intern Med.* 109:219; 1988.
- \*76.- Osborne CK. Heterogeneity in hormonal receptor status in primary and metastatic breast cancer. *Oncol* 12:317; 1985.
- \*77.- Tubiana M, Courdi A. Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and longterm survival. *Radiother Oncol.* 15:1-18; 1989.
- \*78.- Hall PA, Levison DA. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol.* 43:184-192; 1990.
- \*79.- Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol.* 160:93-103; 1990.
- \*80.- Altevogt P, Fogel M, SheingSong- Popov R, Dennis D, Robinson P and Schirmache V. Different patterns of lectin binding and cell surface sialylation detected on related high and low metastatic tumor lines. *Cancer Res* 43: 5138; 1983
- \*81.- Fukuda M and Fukuda MN. Cell surface glycoproteins and carbohydrate antigens in development and differentiation of human erythrocytes. In: *The biology of glycoproteins.* (Ed. RJ Ivatt, p183, Plenum Press, New York, 1984)
- \*82.- Fukuda M. *Molecular glycobiology.* Ed. by Minoru Fukuda and Ole Hindsgane. Irl Press, 1994
- \*83.- Hakomori S. Tumor associated carbohydrate antigens. *Ann Rev Immunol* 2: 103-126; 1984
- \*84.- Dabelsteen E, Vedtoe P, Hakomori S, Young WW. Carbohydrate changes specific for blood group antigens in differentiation of human epithelium. *J Invest Dermatol* 79: 3-7; 1982
- \*85.- Kannagi R, Fukushi Y, Tachikawa T, Noda A, Shin S, Shigeta K et al. Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialyl-fucosyl type 2 chain polyfucosamine. *Cancer Res* 46: 2619-2626; 1986
- \*86.- Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*:314:53-57; 1985

- \*87.-Hakomori S. Kannagi R. Glucosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 71: 231-250; 1983
- \*88.-Watkins Wm. Blood-group substances. In the Abo system the genes control the arrangement of sugar residues that determines blood-group specificity. *Science* 152: 172-181, 1966
- \*89.-Watkins WM. Genetics and biochemistry of some human blood-groups. *Proc Roy Soc London B* 202: 31-53; 1978
- \*90.- Watkins WM. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems. In: *Advances in Human Genetics* (ed. Harris H. Hirschorn K), pp1-116.-Plenum Press, New York-London, 1980
- \*91.-Oriol R. Le Pendu J. Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang* 51: 161-171; 1986
- \*92.-Ito N. Nishi K. Nakajima M. Omura Y. Hirota T. Relationship between lectin binding properties and the expression of blood group antigens in vascular endothelia and red blood cells from 18 primate species. *Histochem J* 22: 113-118; 1990b
- \*93.-Oriol R. Cooper JE. Davies DR. Keeling PWN. ABH antigens in vascular endothelium and some epithelial tissues of baboons. *Lab Invest* 50: 514-518; 1984
- \*94.-Socha WW. Marboe CC. Michler RE. Rose EA. Moor-Jankowski J. Primate animal model for the study of ABO incompatibility in organ transplantation. *Transplant Proc* 19: 4448-4455; 1987
- \*95.-Clausen H. Hakomori S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 56: 1-20;
- \*96.-Thomsen O. Recherches sur la differenciation des groupes sérologiques dans l'organisme des cellules organiques et spécialement les cellules des tumeurs. *CR Soc Biol* 104: 501-503; 1930
- \*97.-Torben F. Orntoft Wolf H. Clausen H Dabelsteen E. Hakomori S. Blood group ABH-related antigens in normal and malignant bladder urothelium. Possible structural basis for the deletion of type 2 chain ABH antigens in invasive carcinomas. *Int J Cancer* 43: 774-780; 1989
- \*98.-Lee JS. Ro JY. Sahin AA et al. Expression of blood-group antigen A, a favorable prognostic factor in non small-cell lung cancer. *N Engl J Med*: 324 (16): 1084; 1991
- \*99.-Murata K. Egami H. Shibata Y. Sakamoto K. Musumi A. Ogawa M. Expression of blood group-related antigens ABH, Lewis a, Lewis b, Lewis X, Lewis y, Ca 19-9 and CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia and uninvolved mucosa of the stomach. *Am J Clin Pathol* 98: 67-75; 1992
- \*100.-Ura Y. Dion AS. Williams ChJ. Olsen BD, et al. Quantitative dot blot analyses of blood-group related antigens in paired normal and malignant human breast tissues. *Int J Cancer* 50:57-63; 1992
- \*101.-Jensen EV. Block GE. Smith S. Kyser. DeSombre ER. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl.Cancer Inst Res Monogr* 34:55-70;1971
- \*102.-Fisher B. Costantino J. Remond C. et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node negative breast cancer who have estrogen-receptor positive tumors. *N Engl.J Med* 320:479-484;1989

- \*103.-Bianco AR. Gallo C. Marinelli A. et al. Adjuvant therapy with tamoxifen in operable breast cancer. *Lancet* ii;1095-1099; 1988
- \*104.-Goussard J. Lechevre C. Martin PM. Roussel G. Comparison of monoclonal antibodies and tritiated ligands for estrogen receptor assays in 241 breast cancer cytolsols. *Cancer Res* 46(suppl 8):4282S-4287S;1986
- \*105.- Green GL. Nolan C. Engler JP Jensen Ev. Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5115-5119;1980
- \*106.-Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. *Cancer* 63:1761-1767;1989
- \*107.-Cheng L. Binder SW. Fu YS. Lewin KJ. Demonstration of estrogen receptors by monoclonal antibody in formalin-fixed breast tumors. *Lab Invest* 58:346-353;1988
- \*108.- Shintaku IP. Said JW. Detection of estrogen receptors with monoclonal antibodies in routinely processed formalin-fixed paraffin sections of breast carcinoma. *Am.J.Clin Pathol* 87:161-167; 1987
- \*109.- Immunocytochemical staining of progesterone receptor in paraffin sections of human breast cancers. *Am.J.Pathol* 135:457-468;1989
- \*110.-Shi SR. Key ME. Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed,paraffin-embedded tissues:an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741-748;1991
- \*111.-Szekeres G. Lutz Y. Le Tourneau A. Delaage M. Steroid hormone receptor immunostaining on paraffin sections with microwave heating and trypsin digestion. *The Journal of Histotechnology* 17,4:321-324,1994
- \*112.-Giani C. Campani D. De Negri F. Perpoli F. Capoportì E.Squartini F. Pinchera A. Value of ER-D5 immunocytochemical determination in routine tissue sections of human breast cancer. *Int J Biolog Markers* 4:1-7;1989
- \*113.-Scharl A. et al. Immunohistochemical detection of progesterone receptor in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissue using a monoclonal antibody. *Arch Gynecol Obstet* 247:63-71;1990
- \*114.-Reiner A. et al. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 50:7057-7061;1990
- \*115.-Ranchod M.Kempson RL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum. *Cancer* 39:255-262;1977
- \*116.-Norris HJ. Taylor B. Relationship of histologic features to behaviour cystosarcoma phyllodes:analysis of ninety-four cases. *Cancer* 20:2090-2099;1967
- \*117.-Goellner JR. Carcinoma of the cervix. Clinicopathologic correlation of 196 cases. *Am.J.Clin.Pathol* 66:775-785;1967
- \*118.-Ellison DJ. Nathwani BN. Metter GE.et al. Mitotic counts in follicular lymphomas. *Hum. Pathol* 18:502-505;1987
- \*119.-Donhuijsen K. Mitosis counts: reproductibility and significance in grading of malignancy. *Hum.Pathol* 17:1122-1125;1986

- \*120.-Silverberg SG. *Reproducibility of the mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumors of the uterus.* *Hum.Pathol* 7:451-454;1976
- \*121.-Wright NA. *Cell proliferation in health and disease.* In Anthony PP,MacSween RNM eds. *Recent Adv. Histop.* 12.Edinburgh:Churchill Livingstone,1984;17-33
- \*122.-Malaise EP. Chavaudra N. Tubiana M. *The relationship between growth rate, labelling index and histological type of human solid tumours.* *Eur. J. Cancer* 9:305-312;1973
- \*123.-Dean Pn. Dolbeare F. Gratzner H. Rice GC. Gray JW. *Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrsUrd.* *Cell Tissue Kinet* 17:427-436;1984
- \*124.-Quirke P. Dyson JED. *Flow cytometry;methodology and applications in pathology.* *J.Pathol* 149:79-87,1986
- \*125.-Mason DY. Gatter KC. *The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology.* *J.Clin.Pathol* 40:1042-1054; 1987
- \*126.-Gerdes J. Schwab V. Lemke H. Stein H. *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.* *Int. J. Cancer* 31:13-20;1983
- \*127.-Shonck DM. Kuijpers HJK. Van Drunen E. et al. *Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10.* *Hum. Genet* 83:297-299;1989
- \*128.-Fonastch C. Ducrow M. Reider H. Schüter C. Gerdes J. *Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25 qter.* *Genomics* 11:476-477;1991
- \*129.-Gerdes J. Li L. Schüter C. Druchrow M. et al. *Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.* *Am. J. Pathol* 138:867-873;1991
- \*130.-Sasaki K. Murakami T. Kawasaki M. Takahashi M. et al. *The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression.* *J.Cell Physiol* 133:579-584;1987
- \*131.-Guillaud P. du Manoir S. Seigheurin D. *Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic(MRC-5) and mamary tumor cell lines (MCF-7).* *Anal Cell Pathol* 1:25-39;1989
- \*132.-Verheijnen R. Kuijpers HJK. Van Driel R. et al. *Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen.II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes.* *J.Cell Science* 92:531-540;1989
- \*133.-Wersto RP. Hezz F. Gallagher RE. Koss LG. *Cell cycle-dependent reactivity with monoclonal antibody Ki-67 during myeloid cell differentiation.* *Experimental Cell Res* 179:79-88;1988
- \*134.-Baisch H. Gerdes J. *Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide:analysis by flow cytometry.* *Cell Tissue Kinet* 20:387-391;1987
- \*135.-Braun N. Papadopoulos T. Muller-Hermelink Hk. *Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells.* *Virchows Archiv.[Cell Pathol]* 56:25-33;1988
- \*136.-Fallini B. Fleughi L. Fagioli M. et al. *Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody.* *J. Histochem. Cytochem* 37:1471-1478;1989

- \*137.-Brown DC. Cole D. Gatter KC. Masson DY. Carcinoma of the cervix uteri:an assessment of tumor proliferation using the monoclonal antibody Ki-67. *Br.J. Cancer* 57:178-181;1988
- \*138.-Patsouris E. Stocker V. Kallmeyer V. Keiditsch E. Mehraein P. Stavrou D. Relationship between Ki-67 positive cells, growth rate and histological type of human intracranial tumors. *Anticancer Res* 8:537-544;1988
- \*139.-Shibata T. Burger PC. The use of monoclonal antibody Ki-67 in determination of the growth fraction in pediatric brain tumors. *Childs Nerv.Syst* 3:364-367;1987
- \*140.-Veda T. Aozasa K. Tsujimoto M. et al. Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer* 63:1607-1611; 1989
- \*141.-Costa J. Wesley RA. Glastein E. Rosenberg SA. The grading of soft tissue sarcomas: Results of a clinicohistopathologic correlation in a series of 163 cases. *Cancer* 53:530-554;1984
- \*142.-Schrapp S. Jones DB. Wright DH. A comparison of three methods for determination of the grow fraction in non-Hodgkin's lymphoma. *Br.J.Cancer* 55:283-286;1987
- \*143.-Grogan TM. Lippman SM. Spier CM. et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 71:1157-1160;1988
- \*144.-Barnard NJ. Hall PA. Lemoine NR. Kadar N. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J.Pathol* 152:287-295;1987
- \*145.-Gerdes J. Lellé RJ. Pickartz H. et al. Growth fraction in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. *J.Clin.Pathol* 39:977-980; 1986
- \*146.-Ostertag CB. Volk B. Shibata T. Burger P. Kleihues P. The monoclonal antibody Ki-67 as a marker for proliferating cells in stereotactic biopsies of brain tumours. *Acta Neurochir* 89:117-121;1987
- \*147.-Scott CS. Ramsden W. Limbert HJ. Master PS. Roberts BE. Membrane transferrin receptor(TfR) and nuclear proliferation-associated Ki-67 Expression in hemopoietic malignancies. *Leukemia* 2:438-442;1988
- \*148.-Brown DC. Gatter KC.Mason DY. Proliferation in non-Hodgkin's lymphoma:a comparison of Ki-67 staining on fine needle aspiration and cryostat sections. *J.Cin.Pathol* 43:325-328;1990
- \*149.-Ostmeier H. Suter L. The Ki-67 antigen in primary human melanomas-its relationship to mitotic rate and tumor thickness and its stability. *Arch.Dermatol.Res* 281:173-177;1989
- \*150.-Cattoretti G. Becker MHG. Key G. et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3)detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J.Pathol* 168:357-363;1992
- \*151.-Key G. Becker MHG. Baron B. Duchrow M. Schlüter C. Flad H-D. Gerdes J. New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies(MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab. Invest* 68:629-636;1993
- \*152.-Celis JE. Madsen P. Celis A. Nielson HV. Gesser B. Cyclin(PCNA,auxiliary protein of DNA plumerase delta) is a central componentof the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 220:1-7;1987

- \*153.-Morris GF. Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 264:13856-13864;1989
- \*154.-Miyachi K. Fritzler MJ. Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121:2228-2234;1978
- \*155.-Bravo R. Fey SJ. Bellatin J. Larsen PM. Arevalo J. Celis JE. Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp.Cell Res* 136:311-319;1981
- \*156.-Mathews MB. Bernstein RM. Franza BR. Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309:374-376;1984
- \*157.-Bravo R. Frank R. Blundell PA. Macdonal -Bravo H. Cyclin\PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326:515-520; 1987
- \*158.-Jaskulski D. deRiel JK. Mercer WE. Calabretta B. Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA Cyclin. *Science* 240:1544-1546;1988
- \*159.-Travali S. Ku D. Rizzo MG. Ottavio L. Baserga R. Calabretta B. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 264:-7466-7472;1989
- \*160.-Almendral JM. Huebsch D. Blundell PA. Macdonal-Bravo H. Bravo R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: Homology with DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1575-1579;1987
- \*161.-Wilson GD, Camplejohn RS. Martindale CA. Brock A. Lane DP. Barnes DM. Flow cytometric characterisation of proliferating cell nuclear antigen using the monoclonal antibody PC10. *Eur J Cancer* 28A: 2010-2017;1992
- \*162.-Yamaguchi M.Sishida N. Moriuchi T et al. *Drosophila* proliferating cell nuclear antigen (cyclin)gene: structure, expression during development and specific binding of homeodomain proteins to its 5'-flanking region. *Mol.Cell.Biol* 10:872-879;1990
- \*163.-Suzuka Y. Daidoji H. Matsuoka M. et al. Gene for proliferating-cell nuclear antigen(DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 16:3189-3193;1989
- \*164.-Baserga R. Growth regulation of the PCNA gene. *J.Cell.Sci* 98:433-436;1991
- \*165.-Shipman-Appasamy P. Cohen KS. Prystowsky MB. Interleukin 2-induced expression of proliferating cell nuclear antigen is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J.Biol.Chem* 265:19180-19184;1990
- \*166.-Konecki J. Nugent P. Kordowska J. Baserga R. Effect of the SV40T antigen on the post-transcriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase alfa genes. *Cancer Res.* 51:1465-1471;1991
- \*167.-Morris GF. Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J.Biol.Chem.* 264:13856-13864;1989
- \*168.-Ottavio L. Chang CD. Rizzo MG. Petralia S. Travali S. Baserga R. The promoter of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is active in serum deprived cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 169:509-516;1990

- \*169.-Chang CD. Ottavio L. Travali S. Lipson KE. Baserga R. *Transcriptional and posttranscriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. Mol. Cell.Biol. 10:3289-3296; 1990*
- \*170.-Ottavio L. Chang CD. Rizzo MG. Travali S. Casadevall C. Baserga R. *Importance of introns in the grow regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. Mol.Cell.Biol.10:303-309;1990*
- \*171.-Ogata K. Kurki P. Celis JE. Nakamura RM. Tan EM. *Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/Cyclin) associated with DNA replication. Exp.Cell. Res.168:475-486;1987*
- \*172.-Waseem NH. Lane DP. *Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA).Structural conservation and the detection of a nucleolar form. J.Cell. Sci. 96:121-129;1990*
- \*173.-Jalkulskid,Gatti C. Travali S. Calabretta B. Baserga R. *Regulation of the proliferating cell nuclear antigen/cyclin and thymidine kinase mRNA levels by grow factors. J.Biol.Chem. 263:10175-10179;1988*
- \*174.-Huff JP. Roos G. Peebles CL. Houghten R. Sullivan KE. Tan EM. *Insights into native epitopes of proliferating cell nuclear antigen using recombinant DNA protein products. J.Exp.Med.172:419-429;1990*
- \*175.- Hall PA. Levison DA. Woods AI et al. *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections:an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J.Pathol. 162:285-294;1990*
- \*176.-Celis JE. Celis A. *Cell cycle-dependent variations in the distributions of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells:Subdivision of S phase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3262-3266;1985.*
- \*177.-Coon JS. Weinstein RS. *Blood group antigens in tumor cell membranes. Biomembranes 11:173-205;1983*
- \*178.-Stellner K. Hakomori S. Warner GA. *Enzymatic conversion of "H-glycolipid" to A or B-glycolipid and deficiency of these enzyme activities in adenocarcinoma. Biochem. Biophys Res Comm 55:439-455;1973*
- \*179.-Salmon C. *Blood group antigens and malignancy. XV Congress of International Society of Blood Transfusion, 1978)*
- \*180.-Davidsohn Y. *Early immunologic diagnosis and prognosis of carcinoma. Am J Clin Pathol 57:715-730;1972.*
- \*181.-Weinstein RS. Coon J. Alroy J. Davidsohn I. *Tissue-associated histochemistry. Edited by RA DeLellis. New York,Masson Publishing 239-261;1981*
- \*182.-Bhan AK. *Application of monoclonal antibodies to tissue diagnosis. Advances in Immunochemistry. Edited by RA DeLellis. New York, Masson Publishing 1-29;1984*
- \*183.-Damjanov Y. Knowles BB. *Monoclonal antibodies and tumor-associated antigens. Lab Invest 48:51-525;1983*
- \*184.-Chapman CM. Allhoff EP. Proppe KH. Prout GR Jr. *Use of monoclonal antibodies for localization of tissue antigens A and B in transitional cell carcinoma of upper urinary tract. J.Histochem Cytochem 31:557-561;1983*
- \*185.-Finan PJ. Wight DG. Lennox EJ. Sacks SH. Bleehen NM. *Human blood group isoantigen expression in normal and malignant gastric epithelium with anti-A and anti-B monoclonal antibodies. J.Natl Canc Inst 70:679-685;1983*
- \*186.-Morgan WTJ. Watkins WM. *Genetic and biochemical aspects of human blood group ABH,Le a and Le b specificity. Br.Med.Bull25:30-34;1969*

- \*187.-Kuhn R. Baer H.H. Gauhe A. Kristallisation und Konstitutionsermittlung der Lacto-N-fucopentaose. *Chem.Ber* 89:2514-2523; 1956
- \*188.-Watkins WM. Morgan WTJ. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature* 169:825;1952
- \*189.-Watkins WM. Morgan WTJ. Inhibition by simple sugars of enzymes which decompose the blood group substances. *Nature* 175:676-677; 1959
- \*190.-Iseki S. Masaki S. Transformation of blood group substance by bacterial enzyme. *Proc Jap.Acad.Sci* 29:460; 1953
- \*191.-Ceppellini R. Physiological genetics of human blood factors; in Wolstenholme, O'Connor, *Biochemistry of human genetics*. Ciba Fdn.Symp.,pp 242-263(Churchill,London 1959)]
- \*192.-Hakomori S. Blood group ABH and li antigens of human erythrocytes: Chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Semin.Hematol.*18:39-62; 1981
- \*193.-Oriol R. Mollicone R. Coullin P. Dalix AM. Candellier JJ. Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *Acta Pathol Microbiol Immunolo Scand Supp* 100:28-38;1992
- \*194.-Yamamoto FI. Clausen H. White T. Marker J. Hakomori SI. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 354:229-233;1990
- \*195.-Hearn VM. Smith ZG. Watkins WM. An -Nacetyl-D-galactosaminyltransferase associated with the human blood group A character. *Biochem.J* 109:315-317; 1968
- \*196.-Race C. Zideman D. Watkins WM. An D-galactosyltransferase associated with the blood group B character. *Biochem.J* 107:733-735; 1968
- \*197.-Schenkel-Brunner H. Tuppy H. Enzymes from human gastric mucosa conferring blood-group A and B specificities upon erythrocytes. *Nature* 223:1272-1273; 1969
- \*198.-Cook GA. GreenWell P. Watkins WM. A rabbit antibody to the blood -group-A-gene-specified 3-N-acetylgalactosaminyl-transferase. *Biochem.Soc.Trans* 10:446-447; 1982
- \*199.-Takizawa N. Iseki S. Immunochemical specificity of blood group glycosyltransferase; in Yamakawa, Osawa, Handa, *Glycoconjugates*, pp.379-380 (Japanase Scientific Societies Press,Tokyo 1981
- \*200.-Yoshida A. Identification of genotypes of blood group A and B. *Blood* 55:119-123; 1980
- \*201.-Hartman G. Group antigens in human organs; thesis(Munks-gaard, Copenhagen,1941/Army Medical Research Laboratory,Fort Knox;1970
- \*202.-Abe K. Lavery SB. Hakomori S. The antibody specific to type I chain blood group A determinant. *J.Immunol.* 132:1951-1954;1984
- \*203.-Bremer EG. Lavery SB. Sonnino S. Ghidoni R. Canevari S. Kannagi R. Hakomori S. Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by monoclonal antibody Mbr1 expressed in normal and neoplasitic epithelial cell of human mammary gland *J.biol.Chem.* 259:14773-14777;1984

- \*204.-Hakomori S. Monoclonal antibodies directed to cell-surface carbohydrates; in Kennet, Bechtol, Mckeam. Monoclonal antibodies and functional cell lines, pp 67-100(Plenum Press, New York, 1984)
- \*205.-Tatsuhiko N. HirooniF. Yasuyuki S. Tadashi W. Junichi S. Hiroshi T. Association of expression of Blood Group-related Carbohydrate Antigens with prognosis in Breast Cancer. *Cancer* 71(10):3044-3053;1993
- \*206.-Carter CL. Allen A. Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.470 breast cancer cases. *Cancer* 63:181; 1989
- \*207.-Rosen PP. Groshen S. Saigo S. et al. A long term follow-up study of survival in stage I(T1N0M0) and stage II(T1N1M0) breast carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 7:355;1989
- \*208.-Fisher B. Bauer M. Wickernam, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with breast cancer. *Cancer* 52:1551;1983
- \*209.-Clark GM. McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 15(2 suppl):20; 1988
- \*210.-Bustamante-Montes MA. Clark G. Langone G. et al. Histopathological grading of breast specimens correlates with disease free survival in node-negative breast cancer patients[abstract].*Proc Annu Assoc Cancer Res* 30A: 1003;1989
- \*211.-Bloom HJG. Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br.J.Cancer* 11:359-377;1957
- \*212.-Elston CW. Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer.I.The value of histological grade in breast cancer:experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-410; 1991
- \*213.-Barnes R. Masood S. Potential value of hormone receptor assay in carcinoma in situ of breast. *Am J Clin Pathol* 94: 533-537; 1990
- \*214.-Wintzer HO. Zipfel Y. Schulte- Mönning J. Hellerich U. Von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 67: 421-428; 1991
- \*215.-Schimmelpenning H. Eriksson ET. Franzén B. Zetterberg A. Auer GU. Prognostic value of the combined assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and nuclear DNA content in invasive human mammary carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat* 423: 273-279; 1993
- \*216.-Mesa-Tejada R. et al. *Human Pathol* 8:313;1977
- \*217.-Shi SR. Key ME. Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues:an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J.Histochem Cytochem* 39:741;1991
- \*218.-Szekeres G. Lutz Y. Le Tourneau A. Delaage M. Steroid Hormone Receptor Immunostaining on paraffin sections with microwave heating and trypsin digestion. *J. Histotechnology* 17 (4): 321-324,1994
- \*219.-Kell D. Kamel OW. Rouse R. Immunohistochemical analysis of breast carcinoma estrogen and progesterone receptors in paraffin embedde tissue. *Appl Immunohistochem* 1(4): 275-281,1993
- \*220.-Munakata S. Hendricks J. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 0:1-6,1993

- \*221.-Key G. Becker MHG. Baron B. Duchrow M. Schlüter. Flad H-D. Gerdes J. New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generatede against Bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 68(6):629-636,1993
- \*222.-Brozman M. Immunohistochemical analysis of formaldehyde -and tripsin or pepsin- treated material. *Acta Histochem* 63:251-260;1978
- \*223.-Hsu Sm. Raine L. and Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an Avidin-Biotin complex method por studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75(5): 734-738;1981
- \*224.-Hsu SM. Raine L and Fanger H. Use of Avidin-Biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques:A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29(4): 577-580;1981
- \*225.-Banks PM. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in haematopathology. *J Histochem Cytochem* 27(8):1191-1194;1979
- \*226.-Fallini B and Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their applications. *Arch Pathol Lab Med* 107:105-117;1983
- \*227.-Taylor CR. and Kledzik G. Immunohistologic techiniques in surgical pathology -A spectrum of "new" special stains. *Hum Pathol* 12(7): 590-596;1981
- \*228.- De Sombre ER. Carbone PP. Jensen EV. et al. Steroide receptors in breast cancer. *N.Eng.J. Med* 301:1011-1012;1979.
- \*229.- Cooper AP. *The principles and practice of surgery.* Londres E.Cox 1:333-335;1836
- \*230.- Schinzinger A. *Uber carcinoma mammal.* *Verh. Dtsch Ges Chir* 18:28-29;1889
- \*231.- Folca PJ. Glascock RF. and Irvine WT. Studies with tritiumaelabelled hexoestrol in advanced breast cancer. *Lancet* 796-798;1961
- \*232.-Glascock RF. and Hoekstra WG. Selective accumulation of tritium-labelled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. *Biochem J.* 72: 673-682;1959
- \*233.-Jensen EV. Jacobson HI. Flesher JW. et al. Estrogen receptors in target tissues. In: *steroid dynamycs* pp 133-157; Edited by G. Pincus, J. Nakao and JF. Tait. Academic Press, London 1966
- \*234.-Horwitz KB. McGuire WI. Pearson OH. and Segaloff A. Predeicting a response to endocrine therapy in human breast cancer. A hypothesis. *Science* 189:726-727;1975
- \*235.- Horwttz KB. McGuire WI. Pearson OH. and Segaloff A. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear proccesing of estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 253: 2223-2228;1978
- \*236.- McGuire WI. Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 38: 4289-4291;1978

- \*237.- Thorpe SM. Rose C. Rasmussen BB. Mouridsen HT. Bayer T. and Keiding N. (on behalf of the DBCG) Prognostic value of steroids hormone receptors. *Multivariate analysis of low risk, untreated primary breast cancer. Cancer Res* 47: 6126-6133;1987
- \*238.- Jensen EV. and Green GL. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 308:745-747;1984
- \*239.-Schrader WT. New model for steroid hormone receptors. *Nature* 308:17-18;1984
- \*240.- Welshons WV. Luberman ME. and Gorski J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307:747-749;1984
- \*241.- Clark JH. and Peck Jr E. Nuclear retention of receptor-oestrogen complex and nuclear acceptor sites. *Nature* 260: 635-637;1976
- \*242.- Green GL. and Press MF. Application of monoclonal antibodies against strogen and progesterone receptors in the immunocytochemical evaluation of breast carcinomas. In: *Immunological approaches to the diagnosis and therapy of breast cancer.* Edited by RL. Cariani. Plenum Publishing Corp. New York, 1987
- \*243.- Clark GM. Thorpe SM. Rose. C et al. Prognostic usefulness of estrogen receptor immunocytochemical assays for human breast cancer. *Cancer Res* 46 (Suppl):4256-4264; 1986
- \*244.- King WJ. De Sombre ER. Jensen EV. and Green GL. Comparison of cytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast cancer. *Cancer Res*:4669-4671;1985
- \*245.- McCarty SK. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal anti-receptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med* 109: 716-721;1985
- \*246.- Pertschuk LP. Eisenberg KB. Carter AC. and Feldman JG. Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies. *Cancer* 55: 1513-1518;1985
- \*247.- Pertschuk LP. Feldman JG. Einsenberg KB. et al. Immunocytochemical detection of progesterone receptors in breast cancer with monoclonal antibody. Relation to biochemical assay, recurrence-free survival and clinical endocrine response. (Submitted for publication)
- \*248.-Fisher ER. Redmon CK. Hannen L. Rockette H. Fisher B. and collaborating NSABP Investigators. Correlation of strogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. *Cancer* 45: 349-353;1980
- \*249.-Lesser ML. Rosen PP. Senie RT. Duthie K.Menendez-Botet C. Schwartz MK. Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: correlations with epidemiology and pathology. *Cancer* 48: 299-309;1981
- \*250.-Barbi GP. Manoni P. Grozzi P. Nicolo G. Paganuzzi M. Ferrara GB. Correlation between steroid hormone receptors and prognostic factors in human breast cancer. *Oncology* 44: 265-269;1987
- \*251.-Fisher ER. Sass R. Fisher B. and collaborating NSABP Investigators. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project: correlations with concordant and discordant estrogen and progesterone receptors. *Cancer* 59: 1554-1559;1987

- \*252.-Brooks SC. Saunders DE. Singhakowintg A. Vaitkevicius VK. *Relation of tumor content of estrogen and progesterone receptors with response of patients to endocrine therapy. Cancer* 46: 2775-2778;1980
- \*253.-Leclercq G. Heuson JHC. Deboel MC. Legros N. Longeval E. Mattheiem WH. et al. *Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. In: McGuire WL. Raynaud Jp. Bauliu E. editors. Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues. new York: Raven:141-153;1977*
- \*254.-Dressler LG. Seamer LC. Owens MA. Clark GM. McGuire WL. *DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. Cancer* 61: 420-427;1988
- \*256.-Shek LLM. Godolphin W. *Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration and tumor necrosis. Cancer Res* 48: 5565-5569;1988
- \*257.-Sismondì P. Aimone V. Genta F. Voglino G. Deltetto F. Giardina AG. et al. *Prognostic value of estrogen receptor determined by radiochemical vs histochemical methods in breast cancer. Breast Cancer Res Treat* 6: 67-73;1985
- \*258.-Pegoraro RJ. Karman V. Nirmul D. Joubert SM. *Estrogen and progesterone receptors in breast cancer among women of different racial groups. Cancer Res* 46: 2117-2120;1986
- \*259.-Fisher B. Wickerham DL. Brown A. et al. *Breast cancer estrogen and progesterone receptor value: their distribution, degree of concordance and relation to number of positive axillary nodes. J Clin Oncol.* 1: 349-358;1983
- \*260.-Kern WH. *Morphologic and clinical aspects of estrogen receptors in carcinoma of the breast. Surg Gynecol Obstet* 148: 240-242;1979
- \*261.-Knight WAIII. Livingston RB. Gregory EJ. McGuire WL. *Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. Cancer Res* 37: 4669-4671;1977
- \*262.-Hawkins A. WhiteG. Bundred J. Dixon JMJ. Miller WR. Stewart HJ. et al. *Prognostic significance of estrogen and progestogen receptor activities in breast cancer. Br J Surg* 74: 1009-1013;1987
- \*263.-Ruder AM. Lubin F. Wax Y. Geiger A. Alfunday E. Chetrit A. *Estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. Cancer* 64: 196-202;1989
- \*264.-Shek LI. Godolphin W. *Survival with breast cancer: the importance of estrogen receptor quantity. Eur J Cancer* 25: 243-250;1989
- \*265.-Andrey G. Suciù S. pratola D. Sylvester R. Leclercq G. Mendes Da Costa P. et al. *Relation between estrogen receptor concentration and histological factors: their relative prognostic importance after radical mastectomy for primary breast cancer. Eur J Cancer* 25: 319-329;1989
- \*266.- Norris HJ. *Mitosis counting III. Human Pathol* 7: 483-484;1976
- \*267.- Burns B. Curry RH. Bell MEA. *Morphological features of prognostic significance in uterine smooth muscle tumors of the uterus. Hum Pathol* 4: 451-454;1976
- \*268.-Sadler DW. Coghill SB. *Histopathologist, malignaces and undefinied high-power fields. Lancet* y: 785-786;1989
- \*269.-Hendel Y. Frankendal B. (Letter). *Gynecol Oncol* 22: 379;1985

- \*270.-Ellis PSJ. Whitehead R. *Mitosis countin: a need for reappraisai. Hum Pathol* 12: 3-4;1981
- \*271.-Johnson HA. Bond VP. *A method of labelling tissues with tritiated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cellular proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the human breast. Cancer* 14: 639-650;1961
- \*272.-Meyer JS. Hixon B. *Advanced stage and early relapse of breast carcinomas associated with high thymidine labelling indices. Cancer Res* 39: 4042-4047;1979
- \*273.-Meyer JS. Friedman E. McCrate M. Baver WC. *Prediction of early course of breast carcinoma by thimidine labelling. Cancer* 51: 1879-1886; 1983
- \*274.-Tubiana M. Pejovic MH. Chavandra N. Contesso G. Malaise EP. *The long term prognostic significance of the thymidine labelling index in breast cancer. Int J Cancer* 33: 441-445;1984
- \*275.-Holt S. Croton R. Leinster SJ. et al. *In vitro thymidine labelling index in primary operable breast cancer. Eur J Surg Oncol* 12: 53-57;1986
- \*276.-Smallwood JA. Cooper A. Taylor I. *The errors of thymidine labelling in breast cancer. Clin Oncol* 9: 331-335; 1983
- \*277.-Wright NA. Allison M. *The biology of epithelial cell populations. Oxford: Clarendon Press;1984*
- \*278.-Gratzner HG. *Monoclonal antibody to 5-bromo anf 5-iodo desoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science* 218: 474-475;1982
- \*279.-Morstyn G.Hsu SM. kinsella T. Gratzner A. Russo A. Mitchell JB. *Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. J Clin Unvest* 72: 1844-1850;1983
- \*280.-Alpert B. Bray J. lawis J. Raff M. Roberts K. Watson JD. *Molecular biology of the cell. New York and London: Garland* 424-426;1983
- \*281.-Lewin B. *Gene Expression 2. Eukarptic chromosomes 2nd. de. New York. Wiley* 875-878;1980
- \*282.- Warburton D. Henderson AS. *Sequential silver staining and hybridisation in situ nucleolus organising regions in human cells. Cytogenet Cell Genet* 24: 168-175;1979
- \*283.-Buys CHCM. osinga J. *Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by sylver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NOR's. Chromosoma*89:387-396;1984
- \*284.-Photon D. Menager M. Jeanneson P. Himber G. Pigeon F. Aduet J. *Improvement in the staining and in the visualisatrn of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. Histochem J* 18: 5-14;1986
- \*285.-Jan Mohammed RM. Armstrong SJ. Crocker J. Leyland M. Hulten MA. *The relationship between numbers of interphase NOR and NOR-bearing chromosomes in non-Hodgkin´s lymphoma. Pathol* 158: 3-7;1989
- \*286.-Tandler CJ. *An argentaffin component of the nucleolus. J Histochem Cytochem* 2: 165-166;1954
- \*287.-Coons JS. Landay AL. Weinstein RA. *Advances in Flow cytometry for diagnostic pathology. Lab Invest* 57: 453-479;1987

- \*288.-Hedley DW. Friedlander MI. Taylor IW. Rugg CA. Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content in paraffin embedded pathological material using flow cytometry *J Histochem Cytochem* 31: 1333-1335;1983
- \*289.-Aver GU. Arrhenius E. Granberg P. Fox CH. Comparison of DNA distribution in primary human breast cancers and their metastases. *Eur J Cancer* 16: 273-278; 1980
- \*290.-Olszewski W. Darzynkiewicz Z. Rossen PP. Schwartz MK. Melamed MR. Flow cytometry of breast carcinoma I. Relationship of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer* 48: 980-984;1981
- \*291.-Thorud E. Fossa SD. Vaage S. et al. Primary breast cancer. Flow cytometry DNA pattern in relation to clinical and histopathological characteristics. *Cancer* 57: 808-811;1986
- \*292.-Gerdes J. Lemke H. Baisch H. Wacker HH. Schwab V. Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody. *J Immunol* 13: 1710-1715;1984
- \*293.-Hall PA. Richards MA. Gregory WM. d'Ardenne AJ. Lister TA. Stansfeld AG. The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 154: 223-235
- \*294.-Cuevas E. Jones DB. Wright DH. Immunohistochemical detection of tumor growth factor fraction (Ki-67 antigen) in formaline-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 169: 477-478;1993
- \*295.-Gerdes J. Ki-67 and others proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. In: Osborn M. de. *Cancer Biology* vol. Y. London : Saunders Scientific Publications, 99-206;1990
- \*296.-Hall PA. Woods AL. Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet* 23: 505-522;1990
- \*297.-Kubbutat MHG. Key G. Duchrow M. Schlüter C. Flad HD. Gerdes J. epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J Clin Pathol* 47: 524-528;1994
- \*298.-Gerdes J. Dallenbach F. Lennert K. Growth fraction in malignant non Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 2: 365-371;1984
- \*299.-Zuber P. Hamou MF. de Trinbolet N. identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery* 22:364-368;1988
- \*300.-Lellé RJ. Heindrich W. Stauch G. Gerdes J. The correlation of growth fraction with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer* 59: 83-88;1987
- \*301.-Bouzubar N. Walker KJ. Griffiths K. et al. Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological clinical associations. *Br J Cancer* 59: 943-947;1989
- \*302.-Raymond WA. Leong AS-Y. The relationship between growth fractions and oestrogen receptors in human breast carcinoma, as determined by immunohistochemical staining. *J Pathol* 158:203-211;1989
- \*303.-Bravo R. Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of Hella cells. *J Immunol* 121:2228-2234;1978

- \*304.-Nishida C. Reinhard P. Linn S. DNA repair synthesis in human fibroblast requires DNA polimerase delta. *J Biol Chem* 263: 4591-4595;1989
- \*305.-Lin YC. Marraccino RL. Keng PC. Bambara RA. Lord EM. Chow WG. Zain SB. Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry* 28: 2967-2974;1989
- \*306.-Bravo R. Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105: 1549-1554;1987
- \*307.-Meyer JS. McDivitt RW. Stone KR. Prey MU. Baver WC. Practical breast carcinoma cell Kinetics: review and update. *Breast Cancer Res Treat* 4: 79-88;1984
- \*308.-Falkmer VG. Hagmar T. Aver G. Efficacy of combined image and flow cytometric DNA assesments in human breast cancer: a methological study based on a routine histopathological metrial of 2024 excised tumor specimens. *Anal Cell Pathol* 2: 297-312;1990
- \*309.-Garcia RL. Coltrera MD. Grown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA /cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. comparison with flow cytometric analysis. *AM J Pathol* 134:733-739;1989
- \*310.-Jaskulski D. Gatti G. Travalli S. Calabretta B. Baserga R. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine Kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 263: 10175-10179;1988
- \*311.-Kamel OW. LeBrun DP. Davis AE. Berry GJ. Wamke RA. Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2: correlation with Ki-67 labeling. *Am J pathol* 138: 1471-1477;1991
- \*312.-Woods AL. Hall PA. Shepherd NA. Hanby AM. Waseem NH. Lane DP. et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 19: 21-27;1991
- \*313.-Takahashi H. Strutton GM. parsons PG. Determination of proliferatin fraction in malignant melanomas by anti-PCNA/cyclin monoclonal antibody. *Histopathology* 18: 221-227;1991
- \*314.-Jain S. Filipe MI. Hall PA. Waseem N. Lane DP. Levison DA. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 44: 655-659;1991
- \*315.-Battersby S. Anderson TJ. Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/cyclin. *hum Pathol* 21: 781-784;1990
- \*316.-Ropbbins BA. de la Vega D. Ogata K. Tan EM. nakamura RM. immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch pathol Lab Med* 111: 841-845;1987
- \*317.-Bianchi S. Paglierani M. Zampi G. Cardona G. Cataliotti L. Bonardi R. et al. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in lymph node-negative breast cancer patients. *Cancer* 72. 120-125,1993
- \*318.-Tahan SR. neuberg DS. Dieffenbach A. Yacoub L.. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 71. 3552-3559;1993

- \*319.-Maier H. Hittmair A. Mikuz G. Comparison of immunohistochemical labelling with antibodies against Ki-67 (MIB-1) and proliferative cell nuclear antigen (PC10). (Submitted for publication)
- \*320.-Fukuda M. Cell surface glycoconjugates as onco-differentiation markers in haematopoietic cells. *Biochem Biophys Acta* 780:119;1985
- \*321.-Warren I. Buck CA. and Tuszynski GP. Glycopeptide changes and malignant transformation. A possible role for carbohydrates in malignant behavior. *Biochem Biophys Acta* 516: 97-123;1978
- \*322.-Ashall F. Bramwell ME. and Harris H. A new marker for human cancer cells: The Ca antigen and the Ca 1 antibody. *Lancet* 2:1-6;1982
- \*323.-Hakomori S. Wang SM. and Young WW.Jr. Isoantigenic expression of Forssman glycolipid in human gastric and colonic mucosa: its possible identity with "A-like-antigen" in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3023-3027;1977
- \*324.-Hakomori S. Nudelman E. Lavery SB. and Kannagi R. Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. Y. Glycolipids with di-or trifucosylated type 2 chain. *J Biol Chem* 259:4672-4680;1984
- \*325.-Kannagi R. Stroup R. Cochran AN. Urdal DL. et al. Factors affecting expression of glycolipid tumor antigens: influence of ceramide composition and coexisting glycolipid on the antigenicity of gangliosialosyl-ceramide in murine lymphoma cells. *Cancer Res* 43:4997-5005;1983
- \*326.-Fukushi Y. Hakomori S. Nudelman E. and Cochran N. Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. II. selective isolation of hybridoma antibodies that differentially recognize mono-di and trifucosylated type 2 chain. *J Biol Chem* 259: 4681-4685;1984
- \*327.-Fukushima J. Hirota M. Tersaki PI. Wakisata A. et al. Characterization of a new tumor-associated antigen: sialosylated Lewis x. *Cancer Res* 44: 5279-5285;1984
- \*328.-Chandrasekaran EV. Davila M. Nixon DW. Goldfarb M. and Medicino JF. Isolation and structures of the oligosaccharide units of carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem* 258: 7213-7222;1983
- \*329.- Chandrasekaran EV. Davila M. Nixon DW. and Medicino JF. Structures of the oligosaccharide chains of two forms of alpha-1 acid glycoprotein purified from liver metastases of lung, colon, and breast tumors. *Cancer Res* 44: 1557-1567;1984
- \*330.-Santer UV. Glick MC. van Halbeek H. and Vliegenthart JFG. Characterization of the neutral glycopeptides containing the structure alpha-L fucopyranosyl-(1-3)-2 acetamido-2deoxy-D glucose from human neuroblastoma cells. *Carbohydr Res* 120:197-213;1983
- \*331.-Nudelman E. Hakomori S. Kannagi R. Lavery S. et al. Y. characterization of human melanoma-associated ganglioside antigen defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 257:12752-12756;1982
- \*332.-Nudelman E. Kannagi R. Hakomori S. Parsons M. et al. A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma defined by a monoclonal antibody. *Science (Wash DC)*220: 509-511;1983
- \*333.-Knipe B. Monner DA. Burrichter H. Diehe V. and Muhiradt PF. Gangliosialosylceramide (asialo GM2), a glycosingolipid marker for cell lines from patients with Hodgkin's disease. *J Immunol* 131: 1591-1594;1983

- \*334.-Koprowski H. Hertyn M. Steplewski Z. and Sears HF. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science (Wash DC)* 212: 53-55;1981
- \*335.-van der Bergh FAJTM. and Tager JM. Localization of neutral glycosphingolipids in human plasma. *Biochem Biophys Acta* 441: 391-402;1976
- \*336.-Dnistrian AM. Schwartz MK. Katapodis N. Frachia AA. and Stock CC. Serum lipid-bound sialic acid as a marker in breast cancer. *Cancer (Phila)* 50:1815-1819;1982
- \*337.-Kloppel TM. Keeran TW. Freeman MJ. and Morre DJ. Glycolipid-bound sialic acid in serum: increased levels in mice and human bearing mammary carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3011-3013;1977
- \*338.-Esselman WJ. and Miller H. Modulation of B cell responses by glycolipid released from antigen-stimulated T cells. *J Immunol* 119: 1994-2000;1977
- \*339.-Krishnaraj R. Lengle EE. and Kemp RG. Murine leukemia, proposed for gangliosides in immune supression. *Eur J Cancer Clin Oncol* : 89-98;1982
- \*340.-Ladisch S. Gillard B. Wong C. and Ullsh L. Shedding and immunoregulatory activity of YAC-1 lymphoma cell ganglioside. *Cancer Res* 43:3808-3813;1983
- \*341.-Portoukalian J. Geneve J. Gerard JP. and Dove JF. Influence of melanoma tumor gangliosides on lymphocyte stimulation and NK activity in normal donors and melanoma patients. In: *Proceedings of the 13th International Cancer Congress, Abstract 2545, p 446. Seattle:13th International Cancer Congress Inc;1982*
- \*342.-Marcus DM. A review of the immunogenic and immunomodulatory properties of glycosphingolipids. *Mol Immunol* 1083-1091;1985
- \*343.-Brady RO. and Fishman P. Biosynthesis of glycolipids in virus-transformed cell. *Biochem Biophys Acta* 335:121-148;1974
- \*344.-Narasimhan S. Shirley M. Hewitt JM. Freedman MH. et al. UDP-GlcNAc: GnGn (GlcNAc to Man beta 1-4) beta 4-GlcNAc-transferase III(GnTIII) in human tissues. *Fed Proc* 42:2199;1983
- \*345.-Hakomori S. and Kannagi R. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 71:231-251;1983
- \*346.-Kapadia A. Feizi T. and Evans MJ. Changes in the expression and polarization of blood group Y and i antigens in post-implantation embryos and teratocarcinomas of mouse associated with cell differentiation. *Exp Cell Res* 131:185-195;1981
- \*347.-Gooi HC. Feizi T. Kapadia A. Knowles BB. Solter D. and Evans JM. Stage-specific embryonic antigen involves alfa 1-3 fucosylated type 2 blood group chains. *Natur* 292: 156-158;1981
- \*348.-Willison KR. Karol RA. Suzuki A. Kunder SK. and Marcus DM. Neutral glycolipid antigens as developmental markers of mouse teratocytomas and early embryos: an immunologic and chemical anlysis. *J Immunol* 129: 603-609;1982
- \*349.-Kannagi R. Cochran NA. Ishigmi F. Hakomori S. et al. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and 4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocytoma cells. *EMBO J* 2: 2355-2361;1983

- \*350.-Bremer EG. Hakomori S. Bowen-Pope DF. Raines E. and Ross R. Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding and receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 259: 6818-6825;1984
- \*351.-Chersh DA. Harper JR. Schultz G. and Riesfeld RA. Localization of the gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5767-5771;1984
- \*352.-Rauvala H. Carter WG. and Hakomori S. Studies on cell adhesion and recognition. V. Extend and specificity of cell adhesion triggered by carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and fibronectin. *J Cell Biol* 88:127-137;1981
- \*353.-Wiels J. Holmes EH, Cochran N. Tursz T. and Hakomori S. Enzymatic and organizational difference in expression of a Burkitt lymphoma-associated antigen (globotriaosylceramide) in Burkitt lymphoma and lymphoblastoid cell lines. *J Biol Chem* 259: 14783-14787;1984
- \*354.-Buczak JD. Soltysiak RM. and Seeley CC. Regulation of membrane-bound enzymes of glycolipid biosynthesis. *J Lipid Res*, in press;1985
- \*355.-Ivatt RJ. Regulation of glycoprotein synthesis by formation of specific glycosyltransferase complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4021-4025;1981
- \*356.-Holmes EH. and Hakomori S. Enzymatic basis for changes in fucoganglioside during chemical carcinogenesis: induction of a specific alpha-fucosyltransferase and status of an alpha-galactosyltransferase in precancerous rat liver and hepatoma. *J Biol Chem* 258: 3706-3713;1983
- \*357.-Ogata S. Muramatsu T. Kobata A. New structural characteristic of the large glycopeptides from transformed cells. *Nature* 259: 580-582;1976
- \*358.-Hakomori S. Young WW. Jr. Tumor associated glycolipid antigens and modified blood group antigens. *Scand J Immunol* 7: 97-117;1978
- \*359.-Dabelsteen E. Fejerskov O. Distribution of blood group antigen A in human oral epithelium. *Scand J Dent Res* 82: 206-211;1974
- \*360.-Feizi T. Turberville C. Westwood JH. Blood group precursors and cancer-related antigens. *Lancet* 2: 391-393;1975
- \*361.-Kapadia A. Feizi T. Jewell D. Keeling J. Slavin G. Immunocytochemical studies of blood group AHI and y antigens in gastric mucosa of infants with normal gastric histology and of patients with gastric carcinoma and chronic benign peptic ulceration. *J Clin Pathol* 34: 320-337;1981
- \*362.-Gooi HC. Williams LK. Vemura K. Hounsell EF. et al. A marker of human foetal endoderm defined by a monoclonal antibody involves type 1 blood group chains. *Mol Immunol* 20: 607-613;1983
- \*363.-Finan PJ. Anderson JR. Doyle PT. Lennox ES. Bleehen NM. The prediction of invasive potential in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 54:720-725;1982
- \*364.-Ernst CS. Shen JW. Litwin S. Herlyn M. Koprowski H. Sears HF. Multiparameter evaluation of the expression in situ of normal and tumor-associated antigens in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 71:387-395;1986
- \*365.-Hoff SD. Irimura T. Matsushita Y. Ota DM. Cleary KR. Hakomori S. Metastatic potential of colon carcinoma: expression of ABO/lewis related antigens. *Arch Surg* 125:206-209;1990

- \*366.-Miyake M. Taki T. Hitomi S. Hakomori S. Correlation of expression of H/Le y/Le b antigens with survival in patients with carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 327:14-18;1992
- \*367.-Idiko HA. Manickavel V. Lewis blood group antigens (a and b) in human breast tissues: loss of Lewis b in breast cancer cells and correlation with tumor grade. *Cancer* 68:1303-1308;1991
- \*368.-Gupta RK. Schuster R. Isoantigens A,B, and H in benign and malignant lesions of breast. *Am J Pathol* 72: 253-260;1973
- \*369.-Strauchen JA. Bergman SM. Hanson TAS. Expression of A and B tissue isoantigens in benign and malignant lesions of the breast. *Cancer* 45: 2149-2155;1980
- \*370.-osborne CK. Yochmowitz MG. Knight W. McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptor in the treatment of breast cancer. *Cancer* 46: 2884-2888;1980
- \*371.-Battifora H. Mehta P. Ahn C. Esteban J. Estrogen receptor immunohistochemical assay in paraffin-embedded tissue. A better gold standard?. *Appl Immunohistochem* 1:39-45;1993
- \*372.-de Negri F. Campani D. Samelli R. et al. Comparison of monoclonal immunocytochemical and immunoenzymatic methods for steroid receptor evaluation in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 96:53-58;1991
- \*373.-Massod S. Dee S. Goldstern JD. immunocytochemical analysis of progesterone receptors in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 96:59-63;1991
- \*374.-Andersen J. Orntoft TF. Poulsen HS. Immunocytochemical demonstration of estrogen receptors (ER) in formalin-fixed, paraffin-embedded human breast cancer tissue by use of a monoclonal antibody to ER. *J Histochem Cytochem* 36:1553-1560;1988
- \*375.-Momose H. Mehta P. Battifora H. Antigen retrieval by microwave irradiation in lead thiocyanate. Comparison with protease digestion retrieval. *Appl Immunohistochem* 1:77-82;1993
- \*376.-Dookhan DB. Kovatich AJ. Miettinen M. Non enzymatic antigen retrieval in immunohistochemistry. Comparison between different antigen retrieval modalities and proteolytic digestion. *Appl Immunohistochem* 1:149-155;1993
- \*377.- Kell DL. Kamell W. and Rouse RV. immunohistochemical analysis of breast carcinoma estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tissue. Correlation of clones ER1D5 and 1A6 with cytosol-based hormone receptor assay. *Appl Imm* 1(4): 275-281;1993
- \*378.-*Am J Clin Pathol*, Editorial, 1993
- \*379.-Fabris G. Marchetti E. Morgola A. Boggi A. Quezoli P. et al. Pathophysiology of estrogen receptor in mammary tissue by monoclonal antibodies. *J Steroid Biochem* 27:171-176;1987
- \*380.- Sylveatrini R. Sanfilippo O. Tedesco G. Kinetics of human mammary carcinomas and their correlation with the cancer and host characteristics. *Cancer* 34: 1252-1258;1974
- \*381.-Haag D. Goerttler K. Tschahargane P. The proliferative index (PI) of human breast cancer as obtained by flow cytometry. *Pathol Res Pract* 178:315-322;1984

- \*382.-Brown DC. Gatter KC. *Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology* 17:489-503;1990
- \*383.-Walker RA. Compejohn RS. *Comparison of monoclonal antibody Ki-67 reactivity with grade and DNA flow cytometry of breast carcinomas. Br J Cancer* 57: 281-283;1988
- \*384.-Robbins BA. de la Vega D. Ogata K Tan EM. Nakamura RM.. *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid malignancies. Arch Pathol Lab Med* 111:841-845;1987
- \*385.- Figgie C. Reifemberg G. Vogeley KT. Messing M. Roosen N. Wechsler W. *Immunohistochemical demonstration of proliferating cell nuclear antigen in glioblastomas: Pronounced heterogeneity and lack of prognostic significance. J Cancer Res Clin Oncol* 118: 289-295;1992
- \*386.-Thomas M. Noguchi M. Kitagawa H. Kinoshita K. Miyazaki Y. *Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labellin index in breast carcinoma. J Clin Pathol* 46: 525-528;1993
- \*387.-Takahashi H. Oishi Y. Chuang S-S. Morii S. *Effects of tissue fixation and processing on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunocytochemistry. Acta Pathol Jpca* 42(8): 621-623;1992
- \*388.-Lloyd KO. *Blood group antigens as markers for normal differentiation and malignant change in human tissues. Am J Clin Pathol* 87: 129-139;1987
- \*389.-Hakomori S. *Blood group glycolipid antigens and their modifications as human cancer antigens. Am J Clin Pathol* 82: 635-648;1984
- \*390.-Hakomori S. *Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused glycolipids: overview and perspectives. Cancer Res* 45:2405-2414;1985
- \*391.-Coon JS. and Weinstein RS. *Blood group-related antigens as markers of malignant potential and heterogeneity in human carcinomas. Hum Pathol*17: 1089-1106;1986
- \*392.-Lee AK. DeLellis RA. Rosen P. Saigo PE. et al. *ABH blood group isoantigen expression in breast carcinomas. An immunohistochemical evaluation using monoclonal antibodies. Am J Clin Pathol* : 308-319;1985
- \*393.-Narita T. Funahashi H. Satoh Y. Watanaba T. et al. *Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. Cancer* 71(10): 3044-3053;1993
- \*394.-Poste G. Greig R. *The experimental and clinical implications of cellular heterogeneity in malignant tumours. J Cancer Res Clin Oncol* 106:159-170;1983
- \*395.- Sanders EM. and Kent SP. *The distribution of water-soluble blood group A antigen in the human large intestine. A mosaic pattern. Lab Invest* 23:74-78;1970
- \*396.-Cooper HS. Malecha MJ. Bass C. Fagel P. Steplewski Z. *Expression of blood group antigens H-2 Le<sup>y</sup> and sialylated-Le<sup>a</sup> in human colorectal carcinoma. An immunohistochemical study using double-labeling techniques. Amer J Pathol* 138:103-110;1991